



**UNIVERSIDAD DE PANAMA**  
**VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO**

**EVALUACION DE LA VARIEDAD BACTERIANA DEL MOSQUITO *Aedes aegypti*  
DURANTE DOS ESTACIONES CLIMATICAS**

**ALMA Y ORTIZ R**

**TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR POR  
EL GRADO DE MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

**TUTOR**

**JUAN MIGUEL PASCALE MD, PhD**

**PANAMA, REPUBLICA DE PANAMA**

**2017**

57

**Dedicatoria**

Mi trabajo de culminacion de estudios de maestria se lo dedico a todas esas personas afectadas por diversas enfermedades que solo pueden ser tratadas paliativamente debido a que en la actualidad que no existe cura (Cancer o algun tipo de enfermedad que afecte organos vitales)

03 APR 23 9

Se lo dedico a los estudiantes futuros investigadores que desean hacer ciencia un campo de trabajo diferente y complejo espero que un futuro no muy lejano Panama designe mejores presupuestos al impulso de ciencia porque es compromiso la salud la innovacion y el desarrollo de nuevas metodologias para dar respuestas a las necesidades del pais

**Sin ciencia no hay futuro'''**

obsequio del autor

## **Agradecimiento**

Mi primer agradecimiento es a Dios por la oportunidad de completar otra meta profesional por darme fortaleza y sabiduría para no desmayar en culminar con éxito

Mis padres Yolanda y Bienvenido por ser mis pilares mis consejeros y cómplices en cumplir este sueño son mi bendición a mi alma gemela Oliver siempre cuidándome y mi cuñada Ana dándome apoyo moral

Al mi asesor Dr Juan Miguel Pascale por la confianza que depositó durante estos años sus orientaciones y consejos fueron vitales para terminar

A mis asesores internacionales Dr George Dimopoulos y Dr Jose Luis Ramirez que desde sus escritorios dedicaron tiempo a esta investigación al equipo del Dimopoulos Group (April Shuzen Ana Maria, Tui) en la Universidad de Johns Hopkins que durante mi visitas y entrenamientos no dudaron en brindarme todo su apoyo los llevo en mi corazón porque son mis amigos

En el Instituto Conmemorativo Gorgas en especial a el Departamento de Entomología mis principales colegas de campo el Sr Rolando y Sr Rovira al Departamento de Virología y Departamento de Microbiología de alimentos

No puede faltar mis compañeros de Genómica y Proteómica sin ustedes no hubiera sido posible cada granito fue un aporte significativo Alexander Claudia, Juan Migdalys Lauris Oris Ramon Jessica, Sra Maria, Roxana, Jeymi

A mis compañeros de maestría y amigos que forman parte de mi familia gracias por estar pendientes de mi avance

**Alma Y Ortiz R.**

## HOJA DE APROBACION

Los miembros del Jurado Calificador encargado de evaluar el Proyecto de Tesis titulado  
**“EVALUACION DE LA VARIEDAD BACTERIANA DEL MOSQUITO *Aedes*  
*aegypti* DURANTE DOS ESTACIONES CLIMATICAS”** realizada en el Instituto  
Conmemorativo Gorgas de Estudios de la salud (ICGES) por Alma Y Ortiz R. certifican  
de manera satisfactoria la calidad de este trabajo de investigacion

---

Dr. Juan Miguel Pascale MD PhD  
Presidente del Jurado y Asesor de Tesis

---

Azael Saldaña PhD  
Miembro del Jurado

---

Carlos Ramos PhD  
Miembro del Jurado

**INDICE GENERAL**

|                        |            |
|------------------------|------------|
| <b>PORTADA</b>         | <b>I</b>   |
| <b>DEDICATORIA</b>     | <b>II</b>  |
| <b>AGRADECIMIENTOS</b> | <b>III</b> |
| <b>INDICE GENERAL</b>  | <b>VII</b> |
| <b>INDICE CUADROS</b>  | <b>IX</b>  |
| <b>INDICE FIGURAS</b>  | <b>X</b>   |
| <b>ABREVIATURAS</b>    | <b>XII</b> |

## Contenido

|   |    |
|---|----|
| ABSTRACT .....  | 1  |
| RESUMEN .....   | 2  |
| 1. INTRODUCCIÓN .....   | 3  |
| 2. FUNDAMENTO TEÓRICO .....                                   | 6  |
| 2.1 <i>Aedes aegypti</i> en América .....                     | 6  |
| 2.3 Dengue en América.....                                    | 8  |
| 2.3.1 Situación mundial actual.....                           | 10 |
| 2.4 Biología .....  | 11 |
| 2.4.1 Taxonomía .....   | 11 |
| 2.4.2 Ciclo de vida .....                                     | 12 |
| 2.5 Ciclo de infección:.....                                  | 18 |
| 2.6 Mecanismo de infección de un mosquito .....               | 19 |
| 2.7 El mosquito y su sistema inmunológico .....               | 19 |
| 2.8 Contribución de las bacterias en el intestino medio ..... | 24 |
| 3. HIPÓTESIS DE TRABAJO .....                                 | 27 |
| 4. OBJETIVOS .....  | 28 |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL.....                                     | 28 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                | 28 |
| 5.METODOLOGÍA.....  | 29 |
| 5.1 Tipo de Investigación: Observacional.....                 | 29 |
| 5.2 Diseño: Descriptivo.....                                  | 29 |
| 5.3 Universo:.....  | 29 |
| 5.4 Área de estudio: .....                                    | 29 |
| 5.5 Tiempo de desarrollo del estudio: .....                   | 30 |
| 5.6 Tamaño de la muestra:.....                                | 30 |
| 5.7 Disecciones: .....  | 30 |
| 5.8 Cultivos:.....  | 31 |
| 5.9 Identificación de bacterias:.....                         | 31 |
| 5.9.1 Extracción de ADN:.....                                 | 31 |
| 5.9.2 Protocolo de amplificación de 16S rRNA: .....           | 31 |
| 5.9.3 Electroforesis en geles de agarosa: .....               | 32 |
| 5.9.4 Purificación de productos de PCR: .....                 | 32 |

|   |    |
|---|----|
| 5 9 5 Protocolo de secuenciacion  | 32 |
| 5 10 Determinacion de la tasa de infeccion por virus dengue en los mosquitos de campo               | 33 |
| 5 10 2 Amplificacion de Flavivirus  | 33 |
| 5 11 Curvas de crecimiento bacteriano   | 34 |
| 6 RESULTADOS  | 35 |
| 6 1 Mosquitos y bacterias aislados  | 35 |
| 6 2 Cantidad de bacterias en <i>Aedes aegypti</i>   | 38 |
| 6 3 Bacterias para la estacion lluviosa para <i>Aedes aegypti</i>                                   | 40 |
| 6 4 Bacterias para la estacion seca   | 40 |
| 6 5 Microbioma de <i>Aedes albopictus</i>   | 41 |
| 6 6 Bacterias aisladas en estacion lluviosa para <i>Aedes albopictus</i>                            | 42 |
| 6 7 Bacterias aisladas en estacion seca para <i>Aedes albopictus</i>                                | 42 |
| 6 8 Analisis filogenetico   | 45 |
| 6 8 1 Analisis por localizacion geografica y tipo de bacteria gram positiva y gram negativa         | 45 |
| 6 8 2 Comparacion filogenetica entre cepas <i>Staphylococcus</i> y <i>Chryseobacterium</i> aislados | 46 |
| 6 9 Deteccion de virus dengue en las cabezas de mosquitos   | 47 |
| 6 10 Curvas de crecimiento  | 47 |
| 6 10 1 <i>Enterobacter</i>  | 48 |
| 7 DISCUSION   | 49 |
| 8 CONCLUSIONES  | 53 |
| 9 RECOMENDACIONES   | 55 |
| 10 ANEXOS   | 56 |
| 11 BIBLIOGRAFIA   | 62 |



**INDICE DE CUADROS**

|                    |  |           |
|--------------------|--|-----------|
| <b>Cuadro I</b>    | <b>Cuantificacion mosquitos procesados en la estacion lluviosa</b>           | <b>35</b> |
| <b>Cuadro II</b>   | <b>Bacterias aisladas en la estacion seca</b>                                | <b>35</b> |
| <b>Cuadro III</b>  | <b>Cuantificacion mosquitos procesados en la estacion seca</b>               | <b>35</b> |
| <b>Cuadro IV</b>   | <b>Bacterias aisladas en la gira de estacion seca</b>                        | <b>36</b> |
| <b>Cuadro V</b>    | <b>Generos aislados en <i>Aedes aegypti</i>, segun las fases del estudio</b> | <b>37</b> |
| <b>Cuadro VI</b>   | <b>Generos encontrados en <i>Aedes aegypti</i></b>                           | <b>39</b> |
| <b>Cuadro VII</b>  | <b>Generos encontrados en <i>Aedes albopictus</i></b>                        | <b>42</b> |
| <b>Cuadro VIII</b> | <b>Generos encontrados en <i>Aedes albopictus</i> en la estacion seca</b>    | <b>43</b> |

## INDICE DE FIGURAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 1 Distribucion geografica de enfermedades transmitidas por Vectores en la region de las Americas 2013-2016</b>                | <b>5</b>  |
| <b>Figura 2 Distribucion geografica de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes Albopictus</i> en la region de las Americas</b>                  | <b>8</b>  |
| <b>Figura 3 Evolucion de casos Dengue en America 1980-2010</b>  | <b>9</b>  |
| <b>Figura 4 Incidencia de Dengue en las Americas</b>  | <b>10</b> |
| <b>Figura 5 Riesgo Global de Dengue Determinacion del estatus del riesgo Combinando reportes de La Organizacion Mundial de la Salud</b> | <b>11</b> |
| <b>Figura 6 Mosquito <i>Aedes aegypti</i> y sus partes</b>  | <b>12</b> |
| <b>Figura 7 Estadios de <i>Aedes aegypti</i></b>  | <b>13</b> |
| <b>Figura 8 Huevos de <i>Aedes aegypti</i></b>  | <b>14</b> |
| <b>Figura 9 Morfologia de la larva de <i>Aedes aegypti</i></b>  | <b>15</b> |
| <b>Figura 10 A <i>Aedes</i> hembra B <i>Aedes</i> macho</b>   | <b>16</b> |
| <b>Figura 11 Principales características distintivas entre mosquitos de las Subfamilias anopheline y culicinae</b>                      | <b>17</b> |
| <b>Figura 12 Ciclo de Transmision de Virus dengue</b>   | <b>20</b> |
| <b>Figura 13 Compartimentos de respuesta inmune</b>   | <b>22</b> |
| <b>Figura 14 Esquematizacion de las barreras físicas y su acción en la invasion por <i>Plasmodium</i></b>                               | <b>23</b> |
| <b>Figura 15 Generos encontrados en <i>Aedes aegypti</i> durante el estudio</b>   | <b>38</b> |
| <b>Fig 16 Generos encontrados en <i>Aedes aegypti</i> durante la estacion lluviosa</b>  | <b>40</b> |
| <b>Fig 17 Generos encontrados en <i>Aedes aegypti</i> durante la estacion seca</b>  | <b>41</b> |
| <b>Figura 18 Generos encontrados en <i>Aedes albopictus</i> durante el estudio</b>  | <b>41</b> |
| <b>Fig 19 Generos encontrados en <i>Aedes albopictus</i> durante la estacion lluviosa</b>   | <b>42</b> |
| <b>Figura 20 Arbol filogenetico de las bacterias aisladas</b>   | <b>44</b> |
| <b>Figura 21 Arbol filogenetico de los <i>Staphylococcus</i> aislados de</b>  | <b>45</b> |

*Ae Aegypti* y *Ae Albopictus*

**Figura 22** Arbol filogenetico de los *Chryseobacterium* aislados de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* **45**

**Figura 23** Curvas de crecimiento **46**

## Abreviaturas

- **ADN** Acido Desoxirribonucleico
- **AMPs** Peptidos antimicrobianos parte de la respuesta inmune
- **ARN** Acido Ribonucleico
- **DENV** Virus Dengue
- **ml** mililitros
- **µL** Microlitros
- **•ICGES** Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud
- **•MINSA** Ministerio de Salud de Panama
- **PCR** Reaccion en Cadena de la Polimerasa
- **Pb** Pares de bases
- **PBS** phosphate buffered saline tampon fosfato salino
- **Rna Later** es un reactivo de almacenamiento acuosa, el tejido no toxico que impregna rapidamente tejidos para estabilizar y proteger el ARN celular solucion RNAlater® minimiza la necesidad de procesar inmediatamente muestras de tejido o para congelar las muestras en nitrogeno liquido para su posterior procesamiento piezas de tejido pueden ser cosechadas y se sumergieron en solucion RNAlater® para el almacenamiento sin comprometer la calidad o cantidad de ARN obtenido despues de la posterior aislamiento de ARN
- **PAHO** Organizacion Panamericana de la salud
- **PRPs** Patrones de reconocimiento
- **16s rRNA** El ARN ribosomal (o ribosomico) 16S (o gen 16 o 16S rRNA) es un componente de la subunidad 30S de los ribosomas procariontes Tiene una longitud de 1 542 nucleotidos El gen 16S rRNA conservado para estudios filogeneticos entre las distintas especies de bacterias y arqueas
- **Rpm** revolucion por minuto
- **TBE** Buffer tris borato y EDTA
- **UV** Luz ultravioleta

## ABSTRACT

### EVALUATION OF BACTERIAL VARIETY OF MOSQUITO *Aedes aegypti* FOR TWO SEASONS AND INTERACTIONS AND EFFECT ON THE ABILITY TO DRIVE VECTORIAL DENGUE VIRUS

Mosquitoes are the most important vectors of human and animal diseases affecting billions of people around the world causing around 50 million dengue cases. Panama has the fifth position of dengue cases in Central America with a co-circulation DEN 1, DEN 2 and DEN 3. Without efficient sanitary measures, rapid vector control interventions and a protective vaccine, we need to use all strategies to control global expansions.

*Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* are the most important vectors in Panama, and both have the same sites to reproduction and feeding. During 2011 we had the highest reported Dengue mortality rate; it was associated to co-circulation of DEN 2 and DEN 1. Since 2014 Chikungunya virus was detected in the country and similar clinical signs and symptoms of Dengue infection complicated the diagnosis. Neither Dengue nor Chikungunya have efficient treatment or vaccine, so the most important preventive measure is vector control.

Environmental variables as now have more interest to study the impact of co-habitant of both vectors: vectorial potential and the microbial diversity of their rich epithelium midgut are important because they have a potential role in the own vector's immunity.

Our aim characterizes bacterias from the gut of field-collected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from regions with high incidence of Dengue.

We collected female mosquitoes from three regions of the country in the field; at the lab, performed dissections of midgut were performed, prepared for bacterial culture; afterwards, picked colonies were extracted and a fragment of the 16S rRNA gene was extracted and sequenced.

We obtained a total of 73 bacteria were characterized *Aedes aegypti* with a phylogenetic distribution: 52.5% Proteobacteria, Firmicutes 21.90%, 16.4% Actinobacteria, 9.5% Bacteroidetes. *Aedes albopictus* would be the first time in Panama that bacterial populations described in the midgut of these mosquitoes. 25 bacteria were characterized; their phylogenetic distribution was as follows: 52% Proteobacteria, 24% Flavobacteria, 20% Firmicutes and 4% Actinobacteria.

*Aedes aegypti* presented a very heterogeneous microbial load during the summer and raining seasons; we obtained predominant genera from phylum Gamma Proteobacteria: genus *Pantoea*, Alphaproteobacteria: genus *Asaia*, Flavobacteria: genus *Chryseobacterium* and genus *Staphylococcus* from Bacilli.

Using this knowledge we have the opportunity to establish new strategies using the microbiome to control the spread of virus in mosquitoes preventing epidemics.

## RESUMEN

### EVALUACION DE LA VARIEDAD BACTERIANA DEL MOSQUITO *Aedes aegypti* DURANTE DOS ESTACIONES CLIMATICAS Y SU INTERACCION Y EFECTO EN LA CAPACIDAD VECTORIAL PARA LA TRANSMISION DEL VIRUS DENGUE

Los mosquitos son vectores de enfermedades humana mas importantes que afectan personas aproximadamente 50 millones de casos a nivel mundial Panama tiene la quinta posicion de casos de dengue en America Central con una co circulacion DEN 1 DEN 2 DEN 3 sin un buen control sanitario y la vacuna, tenemos que utilizar todas las estrategias para controlar la expansion global

*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son los vectores transmisores de arbovirus mas importantes en Panama y ambos comparten sitios de reproduccion y alimentacion En Panama durante el año 2011 se registraron un numero alto de muertes esto fue asociado a la co-circulacion de DEN 2 DEN 1 Desde el 2014 que se detecto Chikungunya, se conoce que produce los mismos sintomas de la infeccion por dengue lo que complica el diagnóstico del virus en humanos Sin un tratamiento o vacunacion es necesario promover el control vectorial para evitar el aumento de casos en el pais

Las variables ambientales tienen gran interes para el estudio del impacto del virus como cohabitante de ambos vectores su potencial vectorial y la rica diversidad microbiana del epitelio del intestino medio Todo estos factores son importantes porque tienen un papel potencial en la respuesta inmunitaria del mosquito

Nuestro objetivo es caracterizar bacterias en el intestino de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en regiones con alta incidencia de dengue y evaluar el efecto de las mismas en la replicacion del virus

Se colectaron mosquitos hembras de tres regiones del pais en el campo en el laboratorio se realizaron disecciones de intestino medio se preparo cultivos bacterianos se extrajo el ADN de las colonias se amplifico un fragmento del gen 16S rRNA y seguidamente se secuenciaron

Encontramos un total de 73 bacterias en *Aedes aegypti* con la siguiente distribucion filogenetica 52.5% Proteobacteria, 21.9% Firmicutes 16.4% Actinobacteria y 9.5% Bacteroidetes Para *Aedes albopictus* se logro caracterizar 25 bacterias su distribucion filogenetica fue la siguiente 52% Proteobacteria, 24 % Flavobacterias 20% Firmicutes y 4% Actinobacteria

*Aedes aegypti* presenta una carga microbiana muy heterogenea durante el verano y en la epoca lluviosa seis generos predominaron del filo Gamma proteobacterias el genero *Pantoea* Alphaproteobacterias el genero *Asaia* Flavobacterias el genero *Chryseobacterium* y el genero *Staphylococcus* del filo Bacillus

Este conocimiento da la oportunidad de establecer nuevas estrategias usando el microbioma para controlar la propagacion del virus en mosquitos y evitar epidemias

## 1 INTRODUCCION

Los insectos constituyen de la fauna mas diversa del planeta se estima la existencia de 1 millon de tipos de insectos validados cientificamente y hay muchos aun en proceso de descubrimiento (Shao et al 2015)

Los mosquitos son las especies de artropodos mas diseminados con un aproximado de 3 500 especies Son considerados de alta importancia en salud publica por ser excelentes vectores de patogenos causantes de multiples enfermedades que son consideradas desatendidas causadas por virus como Dengue Fiebre amarilla, Virus de Oeste del Nilo Chikungunya y trasmisores de parasitos Malaria, Leishmania, Filariasis (Sachs et al 2008) (Ricci Damiani et al 2012)

*Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera Culicidae) y *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera Culicidae) son los principales vectores de enfermedades emergentes propios de nuestra ubicacion geografica la adaptabilidad a las areas tropicales y subtropicales ha facilitado su estancia y convivencia continua, incrementado el riesgo de padecer alguna de estas enfermedades principalmente Dengue

El virus Dengue es el causante de aproximadamente 390 millones de infecciones anuales (95% intervalo de confianza 284–528 millones) de estos 96 millones (67–136 millones) tienen alguna manifestacion clinica (Bhatt et al 2013) Por año 3 9 billones de personas en 128 ciudades estan en riesgo de infectarse (Brady et al 2012)

Este virus tiene dos complicaciones Shock por dengue y Dengue hemorrágico. Actualmente es un gran reto para los sistemas de salud mundiales ya que es causante de por lo menos 200 000 muertes anuales (CDC n.d.). Por ello se han desarrollado pruebas diagnósticas y guías de manejo terapéutico para el abordaje temprano de pacientes con alto riesgo, aunado a la activa intervención antivectorial en las áreas de alta infestación (World Health Organization 2009).

Los niveles de infestación de mosquitos vectores es la única manera de proteger a la población de las arbovirosis.

El control de vectores es un objetivo que debe moverse junto a la globalización y a los cambios demográficos que provocan diferencias en los patrones de infección (rápida propagación, la urbanización, la aparición en países no endémicos). Además, degradación sin precedentes del medio ambiente a nivel mundial está repercutiendo en los niveles y patrones de las enfermedades transmitidas por vectores (Dorn et al. 2011).

Ante la necesidad imperiosa de implementar nuevas estrategias para el control de *Aedes aegypti* debido a la co-circulación de los virus Chikungunya, Zika y Dengue y la ausencia de una vacuna aprobada en Panamá contra estas enfermedades, nuestro interés se concentra en encontrar bacterias propias de la flora del mosquito que pudieran actuar como una barrera biológica contra la replicación del virus dentro del vector.



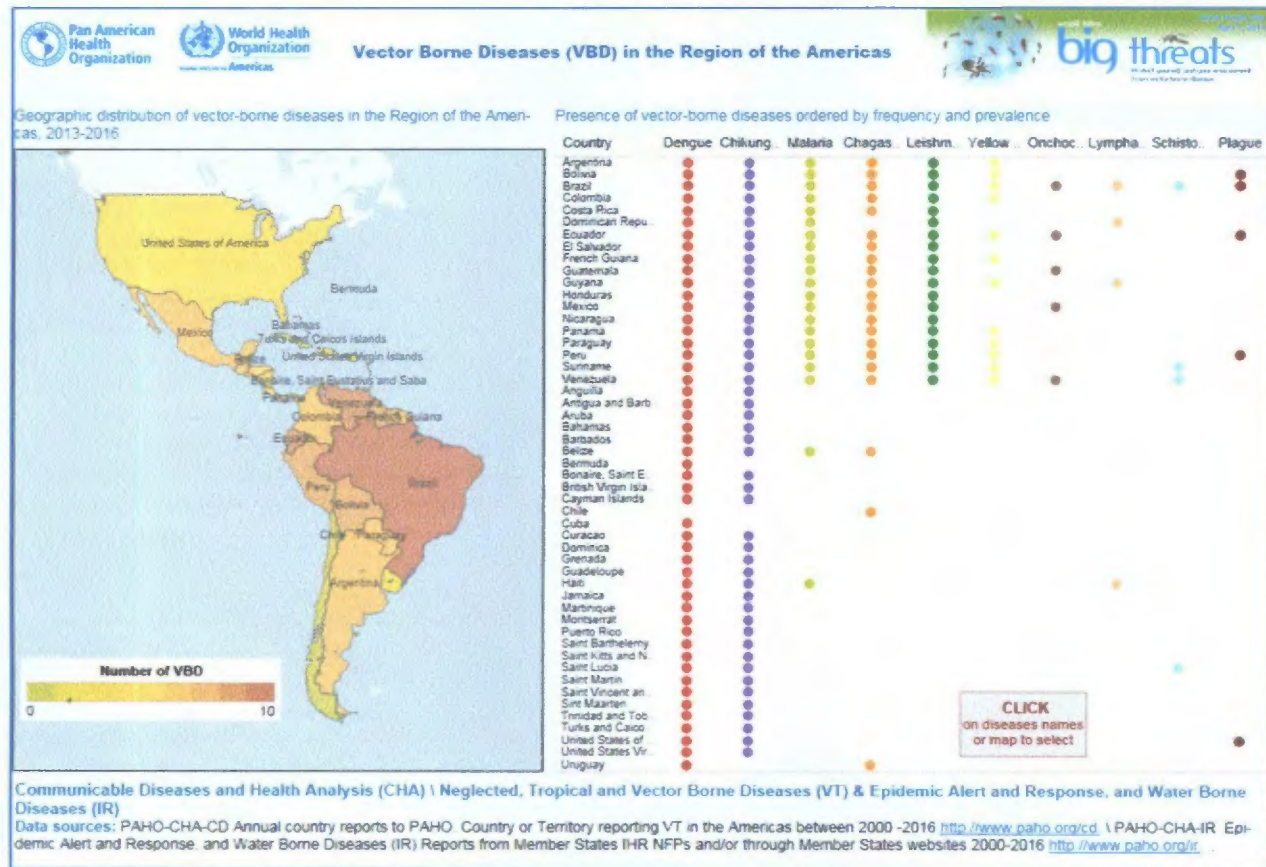


Fig1. Distribución geográfica de enfermedades transmitidas por vectores en la región de las Américas 2013-2016. Fuente: [http://ais.paho.org/phil/viz/cha\\_cd\\_vectorborndiseases.asp](http://ais.paho.org/phil/viz/cha_cd_vectorborndiseases.asp)

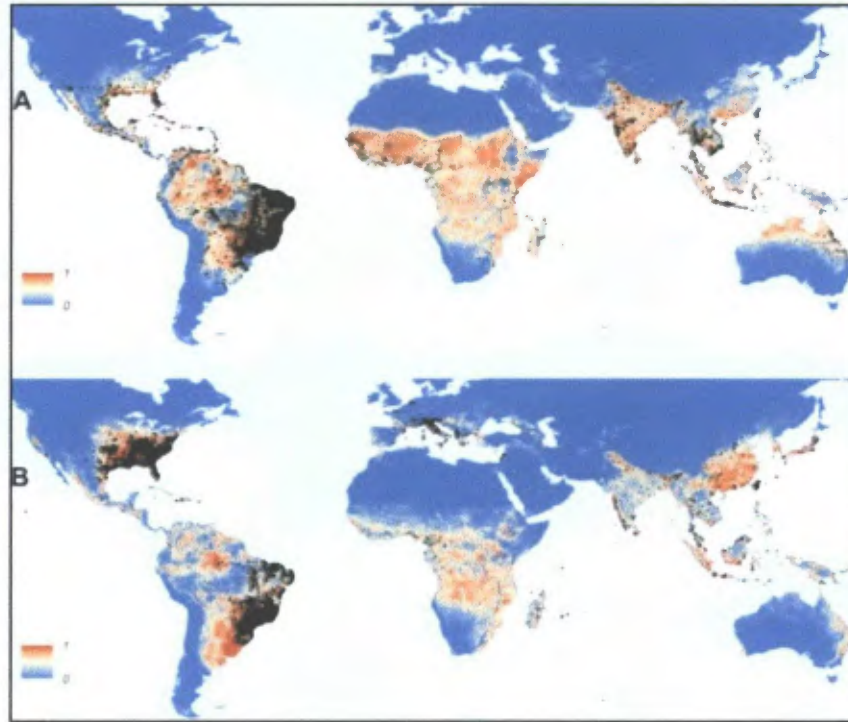
La ubicacion geografica de Panama y su clima caracterizado por veranos y lluvias ha propiciado la estancia de *Ae aegypti* y *Ae albopictus* siendo esto un riesgo constante para la aparicion de brotes de arbovirosis

## **2.2 Distribucion Global del Mosquito *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus***

La distribucion de las dos especies es variada *Ae aegypti* prefiere primariamente las areas tropicales y sub tropicales con altas concentraciones al norte de Brasil y en el Sudeste de Asia incluyendo toda India algunas areas de Europa (España y Grecia) y parte de America del Norte pero parece haber sufrido cambios significativos en varios continentes a traves del tiempo (Jansen and Beebe 2010)

En Australia sin embargo *Ae aegypti* muestra una distribucion geografica mas amplia que *Ae albopictus* que se limita a la costa este lo que refleja en gran medida la distribucion historicamente conocida de *Ae aegypti* (Kraemer et al 2015)

Cabe destacar que *Ae albopictus* se ha expandido un 40 % del planeta en estos ultimos 30 años Para nuestro pais posiblemente se expanda hacia el noroeste y este de Panama, mientras que en la peninsula de Azuero incluye el distrito de Chitre (Miller and Loaiza 2015)



**Fig 2. Distribución geográfica de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en la región de las Américas. Fuente, (Miller and Loaiza 2015)**

### 2.3 Dengue en América

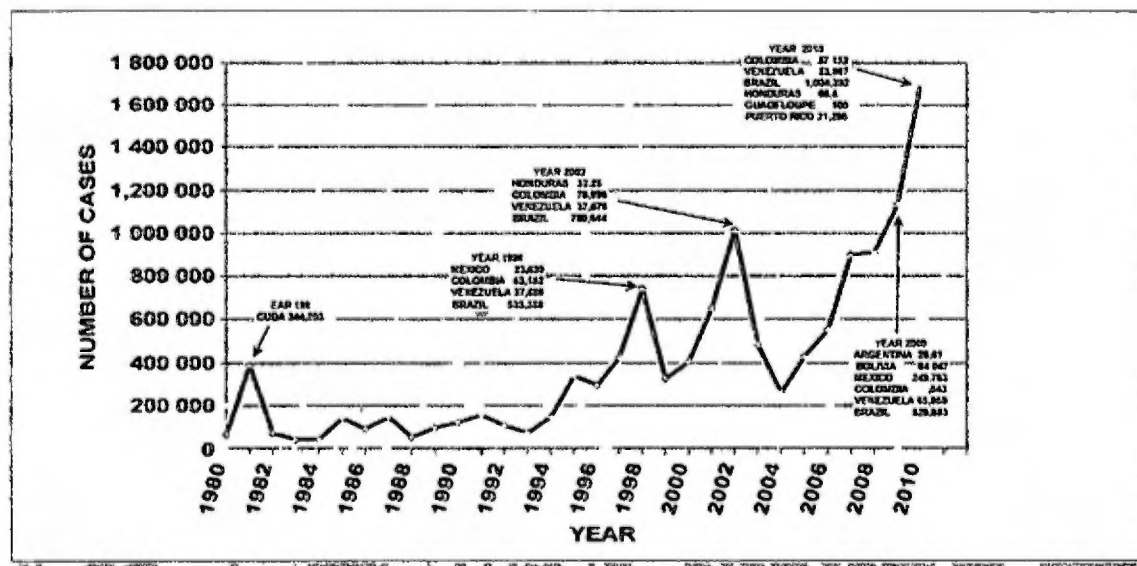
El Dengue en América ha tenido un patrón endemo-epidémico con brotes cada 3 a 5 años. Según patrones de la OPS han ocurrido 4 periodos en la incidencia de dengue en las Américas:

#### 1. 1660-1946 Introducción:

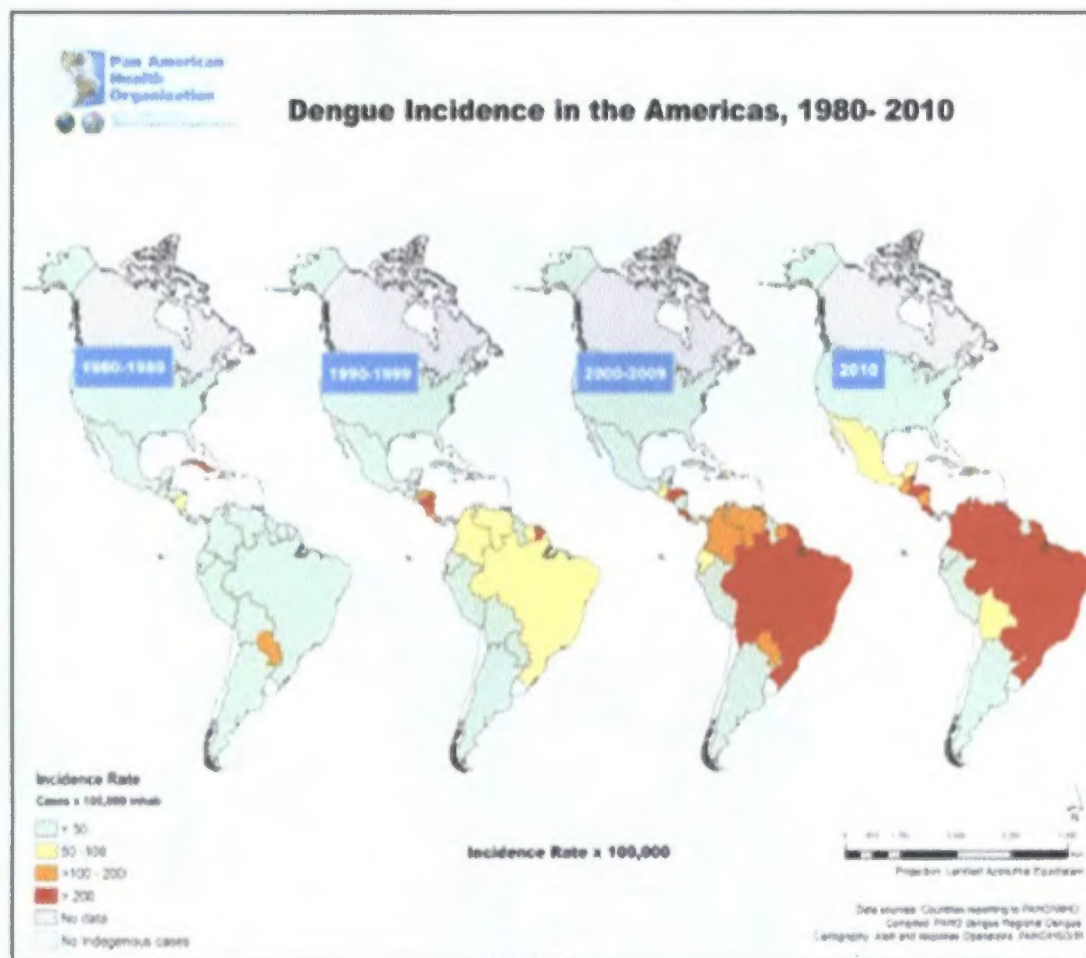
Se sospecha el primer caso en las islas Martinica y Guadalupe 1635 y en Panamá aparece en 1699, aunque es difícil pensar que fueron casos de dengue sin tener los detalles clínicos (Dick et al. 2012).

- 2 1947 1970 Erradicacion En diferentes paises se iniciaron campañas William Gorgas inicio su trabajo en la Habana Cuba y luego en Panama (1901) Todos los paises en la epoca se concentraron en fumigar y eliminar los posibles reservorios de mosquitos ademas la Fundacion Rockeller establecio un programa de control con excelentes resultados debido a que la asociacion mosquito-fiebre amarilla ya era muy bien conocida Durante la epoca se reconocio los usos del DDT entonces la OPS apoyo la aplicacion de DDT a gran escala para erradicar el mosquito en el continente (Dick et al 2012 Soper 1963)
- 3 1971 2000 Re infestacion Una reduccion en los esfuerzos de control en la decada de 1970 promovio la re infestacion de *Ae aegypti* en la mayoria de las regiones de norte y sur America, seguida de aparicion de epidemias de dengue y de casos de fiebre hemorragica por dengue en otras areas (Dick et al 2012 Jansen and Beebe 2010)
- 4 2001 2010 Dispersion y mayor circulacion de Virus Dengue

En este periodo America registro el numero mas alto de casos de dengue con brotes epidemicos en todo el continente y con la presencia de los cuatro serotipos (Dick et al 2012)



**Fig 3 Evolucion de casos Dengue en America 1980-2010 Fuente, (Dick et al 2012)**



**Fig 4. Incidencia de Dengue en las Américas. Fuente;(Dick et al. 2012)**

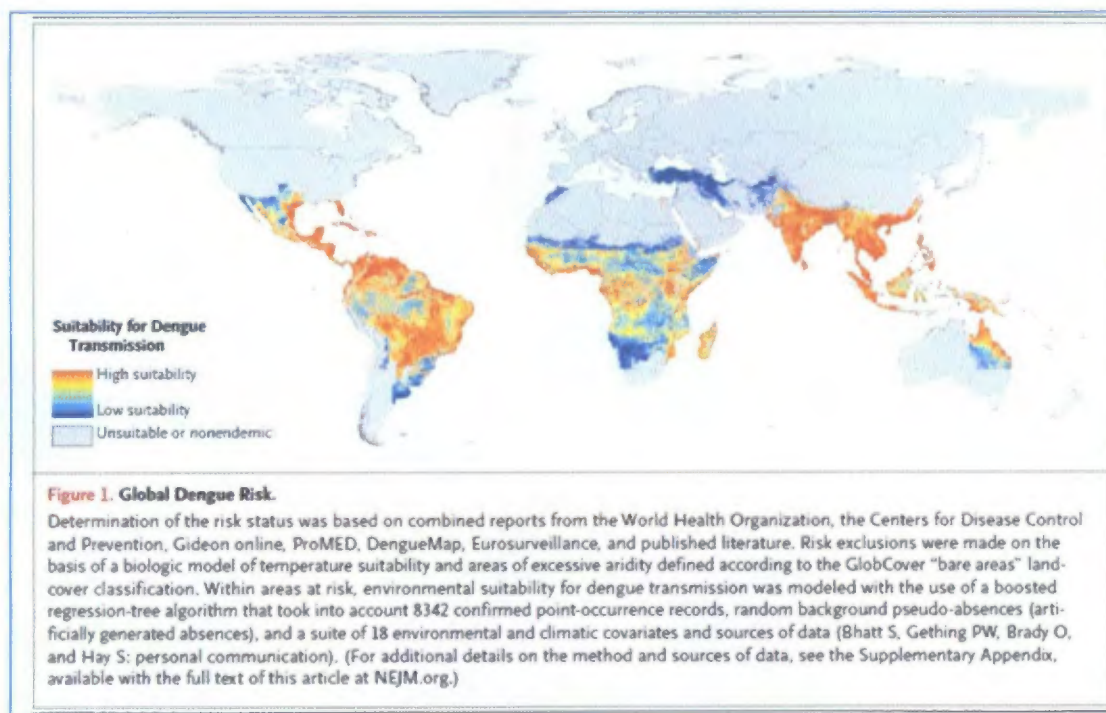
### 2.3.1 Situación mundial actual

La infección por el virus Dengue se considera una enfermedad reemergente, se estima que afecta alrededor de 128 países y con 3,9 millones de personas viven bajo riesgo de padecerlo.

El número de casos de dengue a nivel mundial en el 2017 hasta la semana 39 se calculó 460, 000 casos y 56,867 confirmados por laboratorio Panamá registro durante este año 5,540 casos de dengue, de estos 12 casos han sido dengue severo (Organization n.d.)



Tenemos la co-circulación de DENV-2, DENV-1 y DENV-3 y la presencia de otros virus, con presentación clínica muy parecida, como los virus ZIKA y Chikungunya.(Organization n.d.)



**Fig 5. Riesgo Global de Dengue:** Determinación del estatus del riesgo combinando reportes de La Organización Mundial de la Salud, Centro de Control de Enfermedades EEUU, Gideon online, ProMED, DengueMap, Eurosurveillance and Literaturas Publicadas. Fuente; (Tfelt-Hansen and Koehler 2011)

## 2.4 Biología

### 2.4.1 Taxonomía

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Diptera

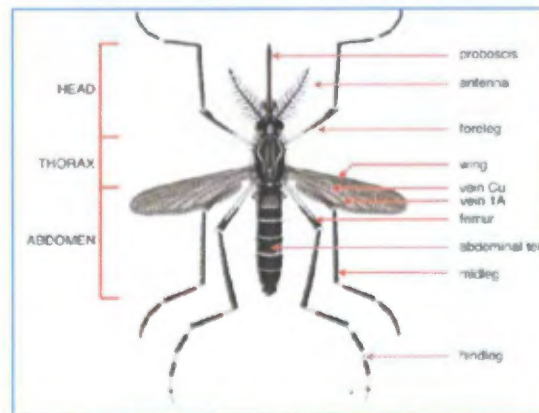
Familia: Culicidae

Género: Aedes

Subgénero: Stegomyia

Especie: *Aedes aegypti* (Lineus 1960)

Las hembras del *Aedes aegypti* se alimentan de la sangre de mamíferos durante el ciclo gonotrófico puede alimentarse de múltiples veces de preferencia en las horas tempranas de la mañana y en el atardecer.



**Fig 6. Mosquito *Aedes aegypti* y sus partes**

#### 2.4.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida comprende 4 estadios principales con características muy especiales. El desarrollo completo se da en un promedio de 7-13 días en países tropicales.

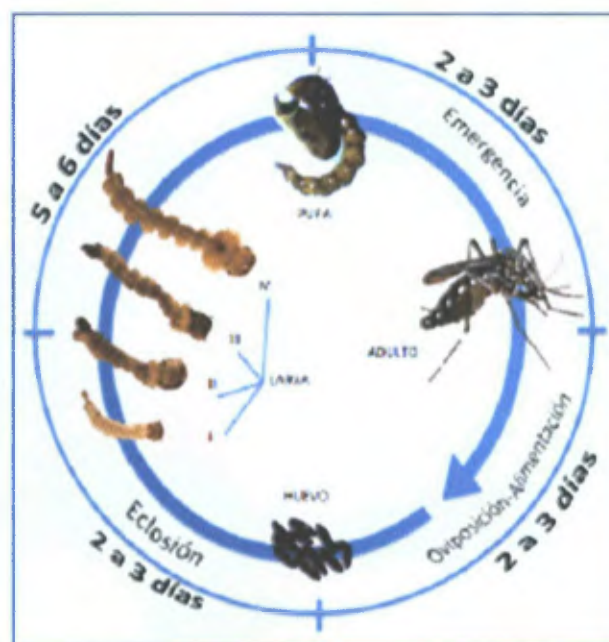
Huevo (2-3 días) Fase Acuática



Larva (1-4 estadios) (5-6 días) Fase Acuática

Pupa (2-3 días) Fase Acuática

Adulto Fase aérea



**Fig 7. Estadios del mosquito *Aedes aegypti*. Fuente:** <http://eubioticos.blogspot.com/2015/05/>

2.4.2 1. Huevo: Los huevos miden aproximadamente 1 mm de longitud, tienen forma de cigarro y son más tersos que los huevos de la mayoría de las especies que se crían en recipientes. Son depositados individualmente por encima del nivel del agua en las paredes del recipiente. En el momento adquieren un color negro brillante. Los huevos son fecundados durante la postura, y el desarrollo embrionario generalmente se completa a las 48 horas si el ambiente es húmedo y cálido, pero puede prolongarse hasta 5 días en temperaturas bajas. Una vez completado su desarrollo embrionario pueden resistir largos periodos de desecación, el cual puede prolongarse por más de un año. Cuando los huevos son mojados se estimula la eclosión, muchas veces en los 15 primeros minutos de contacto con el agua, sin embargo, otros solo responden luego de ser mojados varias veces.

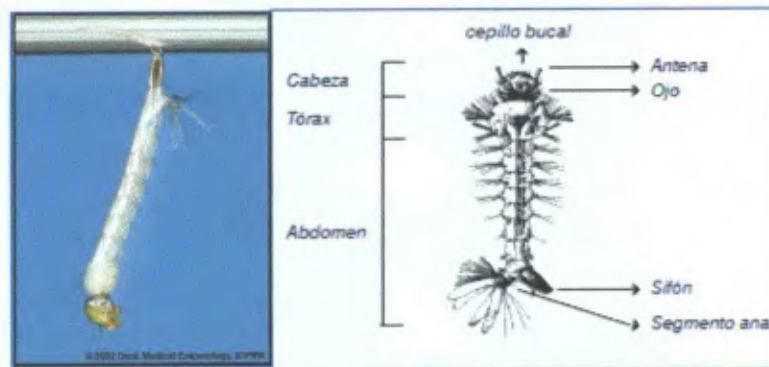
La capacidad de resistencia de los huevos a la desecación es uno de los obstáculos para el control, la eliminación de los mosquitos adultos y larvas en una localidad, no evita la reinfección por huevos que hayan permanecido ocultos en recipientes secos (Nelson 1986).



**Fig 8. Huevos de *Aedes aegypti*.** Fuente; <http://slideplayer.es/slide/1115264/>

2.4.2 2. Larva: La fase larvaria consta de 4 estadios (Larva I-IV) y estrictamente es un estadio acuático donde el mosquito se alimenta de los residuos orgánicos en el recipiente y estará alimentándose la mayor parte del tiempo, usando sus cerdas bucales.

Las larvas de *Aedes aegypti* en características semejantes a la de otras especies por la cabeza, tórax ovoide y abdomen de 9 segmentos. El segmento posterior y anal del abdomen tiene 4 branquias lobuladas y un sifón (tubo de aire, para la respiración en el agua). Pueden distinguirse a simple vista de los otros géneros por el sifón corto la posición de reposo es casi vertical a diferencia de culícidos (en posición de ángulo) o anophelinos (paralelas). Además su movimiento es serpentino.



**Fig 9. Morfología de la larva de *Aedes aegypti*.** Fuente; (Rossi and Almirón 2004)

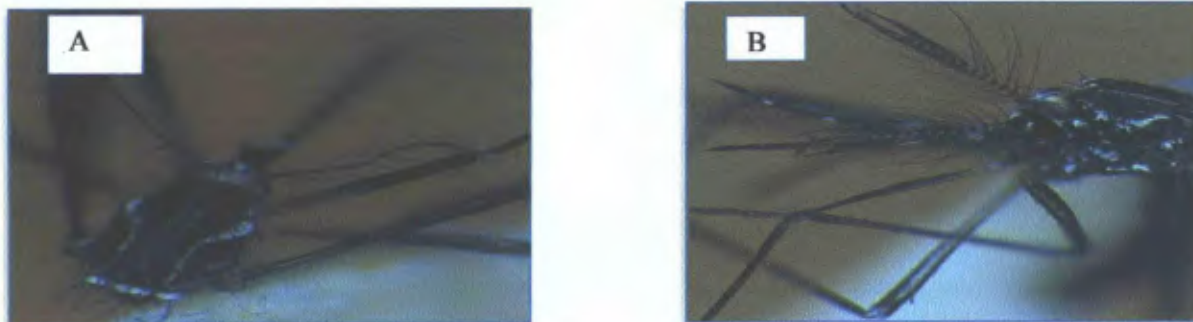
2.4.2 3. Pupa: La última etapa antes de la metamorfosis a la fase adulta. Las pupas no se alimentan pero si poseen un estado de reposo donde se dan modificaciones anatómicas y fisiológicas. Reaccionan a los estímulos externos y se pueden mover por todo el recipiente en donde se están desarrollando.

Generalmente están flotando en la superficie, lo que facilita la emergencia del insecto adulto el estadio pupal dura de 1 a 3 días en condiciones favorables (Nelson 1986).

Las característica que permiten diferenciarlos de otras especies son la presencia un par de tubos respiratorio en la base del abdomen y en la base del abdomen tiene un par de aletas nadatorias (Nelson 1986).

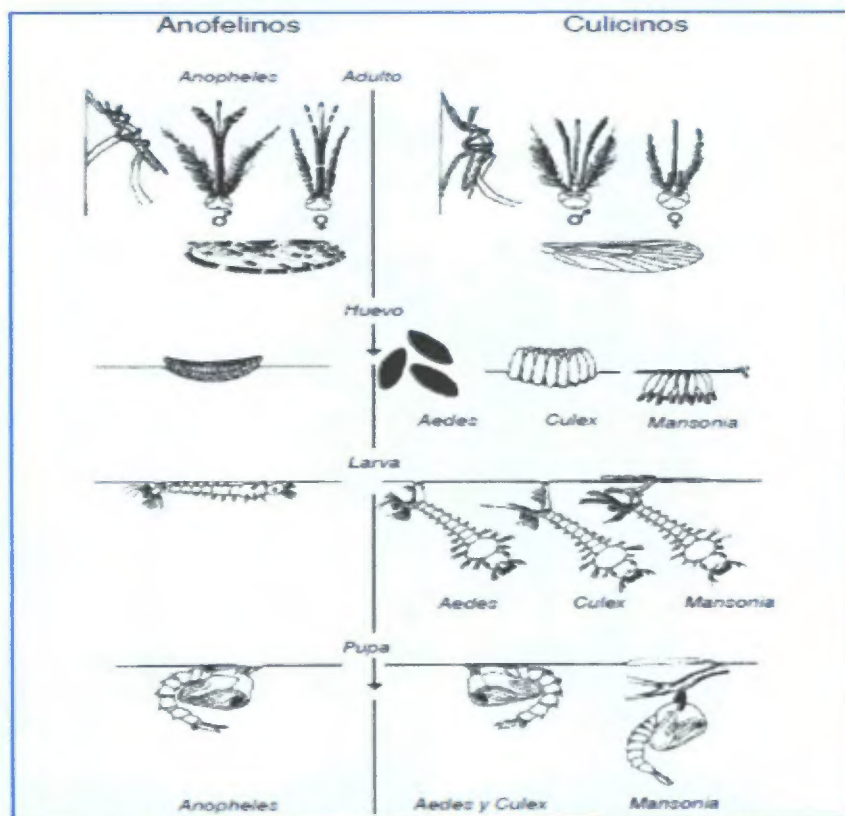
2.4.2 4. Adulto: Fase productora del insecto y la más importante por su dispersión.

Morfología y características: este culicido se caracteriza por presentar palpos cortos y adoptar una posición horizontal durante el reposo. Los Aedes tienen abdomen agudo y carecen de erdas espiculares. Es un mosquito de color oscuro con bandas blancas en las bases de los segmentos tarsales. El macho se diferencia de la hembra por sus antenas plumosas y palpos largos.



**Fig 10. A. Aedes hembra B. Aedes macho.** Proporcionada por el laboratorio de entomología





**Fig 11. Principales características distintivas entre mosquitos de las subfamilias anopheline y culicinae. Fuente; Clave ilustrada**

2.4.3 Emergencia: Luego de emerger el mosquito adulto se posa en las paredes del recipiente durante varias horas para lograr el endurecimiento del exoesqueleto y de las alas en el caso de los machos también la rotación de la terminalia masculina en  $180^\circ$  (Nelson 1986).

2.4.4 Apareamiento: Durante las 24 horas que siguen, los mosquitos pueden aparearse y las hembras pueden alimentarse de sangre. El apareamiento se realiza durante el vuelo pero en ocasiones se lleva a cabo en la superficie vertical u horizontal. El macho sujeta el ápice del abdomen de la hembra con su terminalia e inserta su aedeagus dentro del receptáculo genital de la hembra. La bursa copulatrix de la hembra se llena de espermatozoides, la cual pasa a la espermateca en 1 a 2

minutos. Una inseminación es suficiente para fecundar todos los huevos que la hembra produzca durante toda su vida (Nelson 1986).

2.4.5 Alimentación. Las hembras se alimentan de sangre de la mayoría de los vertebrados pero por lo general elige al hombre. Utilizan las corrientes de aire para desplazarse siguiendo olores o gases emitidos por la fuente de sangre. Logran visualizar su fuente utilizando receptores táctiles y térmicos se guían hasta el lugar donde se alimentarán. La alimentación sanguínea provee la proteína necesaria para el desarrollo de los huevos.

Por otro lado, el macho no tiene las partes bucales adaptadas para succionar sangre, ellos se alimentan de néctar de plantas para suplir sus requerimientos energéticos (Nelson 1986).

2.4.6 Ciclo gonotrófico. Por lo general, después de cada alimentación sanguínea, se desarrolla un lote nuevo de huevos. Si una hembra completa su alimentación puede producir unos 100 huevos. El intervalo de alimentación sanguínea y postura es de 3 días en condiciones óptimas de temperaturas. Además, la hembra puede alimentarse de sangre nuevamente en el mismo día que pone los huevos. Las posturas generalmente se dan al final del día y tiene predilección para depositar los huevos en recipientes oscuros o sombreados, de paredes oscuras, con aguas limpias, claras y transparentes (Nelson 1986).

2.4.7 Rango de vuelo. La hembra de *Aedes aegypti* no sobrepasa los 50 metros de distancia de vuelo durante su vida y a menudo permanece en la misma casa donde emergió siempre que disponga de sitios de reposo y postura adecuados. Si no existen recipientes, la hembra gravida se puede desplazar unos 3 metros en busca de sitios para depositar sus huevos. Los machos se dispersan menos que las hembras.

#### 2.4.8 Sitios comunes donde habita:

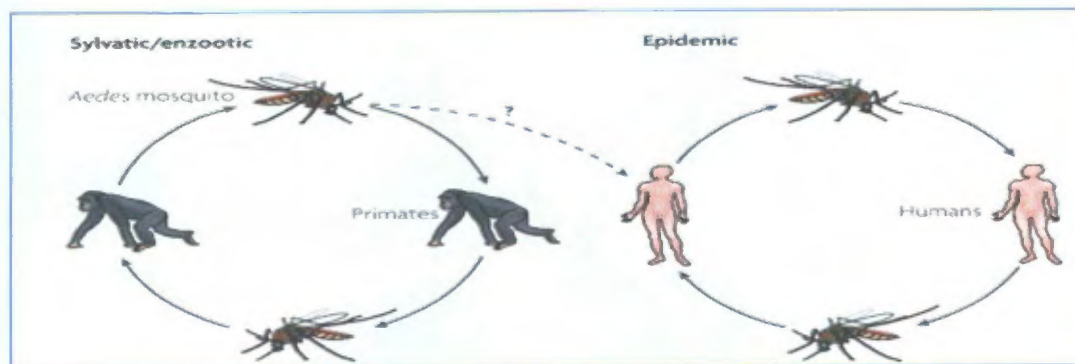
*Aedes aegypti* se ha adaptado a recipientes artificiales que con frecuencia se encuentren lugares oscuros y de preferencia con agua limpia que permita su desarrollo larvario. Los lugares perfectos pueden ser:

Naturales: hojas de plantas, orificios naturales de los árboles.

Artificiales: recipientes de agua, basura mal dispuesta: llantas, latas, plásticos, objetos en desuso (piscina) etc.

#### 2.5 Ciclo de infección

El virus del dengue es un arbovirus que no requiere un ciclo enzoótico para el mantenimiento de la transmisión en seres humanos. Él se mantiene por un ciclo humano-mosquito-humano. El ciclo silvestre de transmisión que ocurre en los bosques de Asia y África occidental entre primates no humanos y los mosquitos, ha contribuido de manera mínima a causar epidemias (Whitehead et al. 2007)



**Fig12. Ciclo de Transmisión del Virus del dengue:** el virus es eficientemente transmitido entre mosquitos y humanos sin necesidad de un ciclo enzoótico. Fuente;(Whitehead et al. 2007)

## **2.6 Mecanismo de infección de un mosquito**

Los mosquitos de los géneros *Culex* y *Anopheles* son vectores eficaces de patógenos humanos y animales. La susceptibilidad o la resistencia a la infección es a menudo el resultado de la intrincada relación co-evolutiva entre el invertebrado y el virus o parásito para sobrevivir e infectar (Hillyer 2010).

La infección comienza cuando la hembra de *Aedes* se alimenta de sangre con viremia de un hospedero humano. El virus infecta inicialmente el intestino medio y luego se disemina a través del cuerpo cuando las glándulas salivares se infectan; entonces la saliva será infecciosa. Cuando la hembra nuevamente desee alimentarse de su fuente de comida (animal o humano) estará expuesta al virus. Si el individuo es infectado por el virus Dengue, otro mosquito puede picarlo y el virus continúa propagándose y diseminándose (Alphey 2009).

La incubación extrínseca en el vector dura 7-14 días volviéndose capaz de transmitir el virus las veces que se alimente de un nuevo individuo (Watts et al. 1987).

## **2.7 El mosquito y su sistema inmunológico**

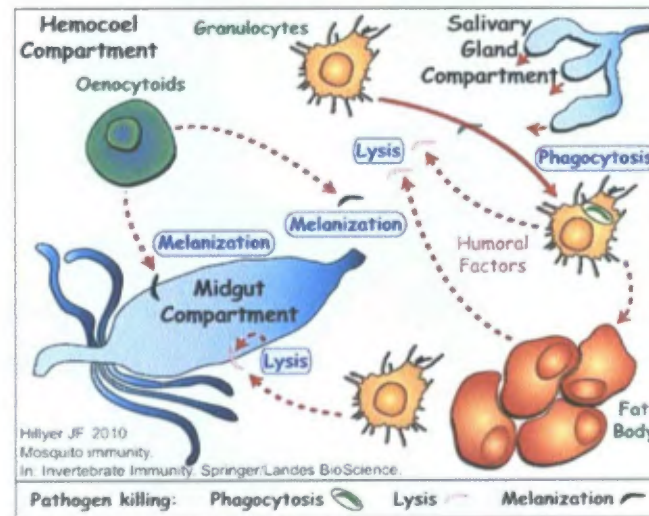
Mientras que la adquisición de patógenos a través de la alimentación de sangre se produce exclusivamente durante la etapa de la vida adulta, la infección a través de la cutícula es probablemente más frecuente durante las etapas de desarrollo acuático cuando los mosquitos viven en entornos plagados de bacterias (Hillyer 2010).

En términos generales, la muerte de patógenos por los mosquitos se logra mediante tres mecanismos principales: mediada por células como la fagocitosis, melanización y lisis.

Cada uno es iniciado por los receptores de reconocimiento de patrones y los factores que conducen a la muerte pueden subdividirse en componentes celulares y humorales. La respuesta celular incluye



la fagocitosis y la encapsulación de hemocitos y células pericárdicas (Hillyer 2010; Hillyer, Schmidt, and Christensen 2003, 2004).



**Fig 13. Compartimentos de respuesta inmune:** La respuesta inmune del mosquito se compone de 3 compartimentos: En el hemocel, granulocitos y hemocitos oenocitoides, así como la grasa corporal, destruyen a los patógenos por medio de fagocitosis, lisis y melanización. Intestino medio, los factores inmunes producidos por las células epiteliales, hemocitos y, posiblemente grasa corporal, eliminan a través de vías líticas y vías de melanización. Poco se sabe sobre el papel que desempeña las glándulas salivares en la respuesta inmune, pero es capaz de producir factores en respuesta a la infección. Fuente: (Hillyer 2010)

2.7.1 Barreras físicas: corresponde a los órganos involucrados en la primera respuesta a los organismos extraños.

#### 2.7.1.1 Intestino medio:

Cuando los patógenos entran al mosquito la barrera inicial física de destrucción es la armadura ciberial, que son dientes esclerotizados y espinas que sobresalen del lumen del intestino anterior y se encarga de cortar aquellos patógenos antes que lleguen al intestino medio; la armadura ciberial es

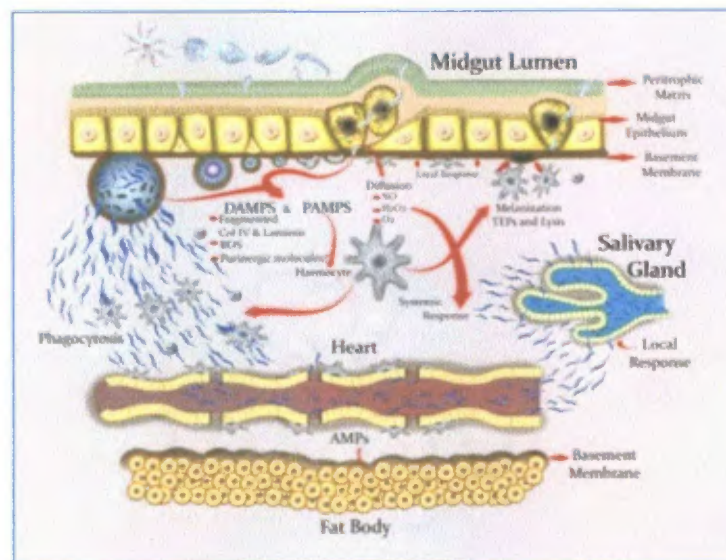


efectiva en parásitos grandes como las filarias pero es poco eficiente en la eliminación de protozoos, bacterias o virus.

Una vez en el lumen del intestino medio, los patógenos deben sobrevivir enzimas digestivas e invaden el epitelio del intestino medio cuando digieren la matriz peritrófica (PM), que se forma en respuesta a la alimentación de sangre o mediante el inicio de la invasión del epitelio antes de la formación de esta matriz (Kato et al. 2008) (Hillyer 2010).

#### 2.7.1.2 La matriz peritrófica quitinosa:

Es secretada por las células epiteliales del intestino medio después de cada comida de sangre. El segundo mecanismo de defensa es el epitelio del intestino medio, constituido por una sola capa de células de superficie redondeada de tejido muscular, delgada y escasamente reticulada; y la membrana basal que es una hoja de proteína extracelular que rodea los tejidos de animales y está compuesta principalmente de laminina, colágeno IV, y proteoglicanos (Moreno-García et al. 2014)



**Fig 14. Esquemización de las barreras físicas en y su acción en la invasión por *Plasmodium*. Fuente: (Moreno-García et al. 2014)**

Las bases de estas reducciones de parásitos son complejas pero incluyen lisis melanización eventos que son controlados por los receptores de patrones de reconocimiento proteasas de serina, sus inhibidores y cascadas enzimáticas (Frature et al 2009) (Dimopoulos et al 1998) (Hillyer 2010)

### 2.7.1.3 Hemocel

El hemocel es una cavidad del cuerpo abierta que contiene todos los órganos viscerales y está delimitada por la cutícula exterior y la lámina basal que rodea los tejidos internos. Por muchas razones incluyendo la prevención de infecciones los insectos han desarrollado una cutícula externa hidrofóbica que protege los órganos internos del ambiente exterior. Las interrupciones de esta cutícula forman aberturas temporales a través de la cual los agentes patógenos pueden entrar. Si bien estas heridas ocurren comúnmente en la naturaleza la coagulación y respuestas melanización que implica contracción de la herida, la desgranulación de hemocitos y la formación de cicatrices para cerrar rápidamente estas lesiones.

Una vez los patógenos atraviesan el intestino medio llegan al hemocel allí se encuentran en un medio rico lleno de nutrientes que contiene las células inmunes y factores inmunes humorales producidos por hemocitos (células inmunitarias) las células del pericardio y grasa corporal. Los hemocitos inician la respuesta inmune innata y se encuentran circulando con la hemolinfa (sangre del mosquito) o unidos a los tejidos viscerales. Están involucrados en la muerte y el secuestro de los agentes patógenos a través de la fagocitosis la nodulación y la secreción de factores de inmunidad humoral (Hillyer et al 2003) (Crimmich et al 2010).

### 2.7.1.4 Glandulas salivares

El punto crítico donde el mosquito puede transmitir patógenos como protozoarios y virus a un huésped requiere que la inyección de la saliva cuando este se alimenta de sangre entonces la

invasión del epitelio salivar y migración en el conducto salivar constituye un requisito para la continuación del ciclo. El epitelio de glándulas salivares forma una barrera física para patógenos. *Plasmodium* y otros patógenos utilizan proteínas para iniciar la invasión usando factores específicos de la superficie de las glándulas salivares (Arca et al. 2005).

## 2.7.2 Sistema inmune: modulación

El sistema inmune innato comprende una variedad de componentes y mecanismos que pueden discriminar entre diferentes microorganismos y montar las respuestas específicas para el control de las infecciones patógenas. Mucho del conocimiento de la respuesta innata de los insectos se ha descrito a partir del modelo de la *Drosophila* (Dimopoulos 2003).

### 2.7.2.1 Patrones de reconocimiento

El primer paso para la iniciación de la respuesta inmune, ya sea humoral o celular, es el reconocimiento del agente. Esto se consigue por medio de los patrones de reconocimiento (PRPs) que se unen a dominios conservados situados en la superficie llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) los cuales activan la producción de moléculas efectoras inmunes intracelulares (Medzhitov and Janeway 1997; Douglas, Bouvaine and Russell 2011; Tsakas and Marmaras 2010; Cirimotich et al. 2010).

### 2.7.2.2 Vías de señalización

Originalmente las tres principales vías de señalización inmune (Toll, IMD y Jak / Stat) se describieron en *Drosophila* o han sido identificadas en *Anopheles gambiae*, transmisor de malaria (Christophides et al. 2002).

Estas cascadas de señalización de reconocimiento regulan la expresión de estos genes de péptidos antimicrobianos.

2.7.2.2.1 Via Toll activada por virus hongos y muchas bacterias Gram positivas Toll no es un receptor de reconocimiento de patrones ya que no se une a patógenos o compuestos derivados de patógenos directamente sino que se activa por citosinas extracelulares. Además controla la expresión de AMPs (Tsakas and Marmaras 2010, Xi, Ramirez, and Dimopoulos 2008).

#### 2.7.2.2.2 Via Lmd

Esta implicada en la defensa contra las bacterias Gram negativas tras su activación se sigue una cascada de acontecimientos similares a los de la vía de Toll que implica la degradación de su regulador negativo Caspar translocación del factor de transcripción Relish en el núcleo y la producción de efectores y compuestos antimicrobianos. Es bastante sensible y controla la síntesis de AMPs (Tzou, Reichhart, and Lemaitre 2002) (Tsakas and Marmaras 2010).

#### 2.7.2.2.2 Via Jak/Stat (Janus quinasa y Activador de la transcripción Stat)

Algunos estudios sobre esta vía habían sido desarrollados en *Drosophila* y *Ae. gambiae* y su relación en la respuesta autoinmune (Gupta et al. 2009) pero al descubrir que la infección por dengue induce dos genes de la Vía Jak Stat Dome y SOCS se demostró su implicación en la respuesta anti dengue dentro del mosquito (Souza Neto, Sim, and Dimopoulos 2009).

### 2.8 Contribución de las bacterias en el intestino medio del mosquito

La estrecha relación entre procariotas y eucariotas son un factor importante en la evolución (Minard, Mavingui, and Moro 2013). La diversificación y éxito evolutivo de los insectos se debe en parte a sus innumerables relaciones con organismos beneficiosos (Engel and Moran 2013).

El tracto digestivo de los insectos alberga una comunidad microbiana variada que incluye levaduras, virus, bacterias y protistas (Minard et al. 2013). Los insectos adquieren constantemente microorganismos de sus hábitats naturales y también se pueden adquirir verticalmente (Coon et al. 2015, Feldhaar and Gross 2008).

Esta diversidad microbiana afecta muchos aspectos de la biología de los insectos como la nutrición la digestión el metabolismo el desarrollo y la inmunidad por lo tanto tiene un gran potencial para alterar la competencia vectorial para arbovirus (Jupatanakul Sim and Dimopoulos 2014)

En los últimos 30 años la investigación sobre la inmunidad de insectos ha florecido proporcionando evidencia abrumadora de los costos ecológicos de la respuesta inmune Mucho del conocimiento del sistema inmune del insecto está basado en el modelo de *Drosophila* (Buchon et al 2009)

Conocer las habilidades que puedan tener las bacterias en modular la respuesta inmune en el mosquito ha provocado creciente interés en los simbiositos como un nuevo método de control lo que se consideraría un control simbiótico (Ricci et al 2011)

También se ha producido un rápido progreso en desentrañar los mecanismos de la respuesta inmune de insectos y sus efectos sobre los patógenos (Cirimotich et al 2010 Ramirez et al 2012 Dong Manfredini and Dimopoulos 2009a)

Se ha probado que el microbioma intestinal puede reducir la susceptibilidad a la infección por patógenos humanos a través de la modulación de la respuesta inmune del mosquito o la producción de moléculas anti parásitos por ciertos miembros de la comunidad microbiana (Bahia et al 2014 Cirimotich et al 2010 Dong Manfredini and Dimopoulos 2009b) *Enterobacter cloacae* por ejemplo induce la activación eficiente de la proteína inmune AsSRPN6 que juega un papel ante la infección por *Plasmodium* *Chromobacterium violaceum* bloquea la infección por *Plasmodium* en *Anopheles gambiae* también ha demostrado tener efecto *Ae aegypti* contra el virus dengue (Ramirez et al 2014)

Se ha reportado la bacteria intracelular *Wolbachia* que se encuentra comúnmente en muchos insectos (aproximadamente 60% de ellos) su incompatibilidad citoplasmática reduce la infección de los arbovirus y plasmodios Sin embargo el mecanismo no está del todo claro pero sugiere las

acciones de genes inductores la respuesta inmune y hasta competencia por ciertos componentes claves como el colesterol (Moreira et al 2009)

### 3 HIPOTESIS DE TRABAJO

La microbiota del intestino medio del mosquito *Aedes aegypti* varia en la estacion seca y estacion lluviosa

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la variación de la microflora de mosquitos *Aedes aegypti* durante las dos estaciones bien marcadas de Panamá: estación lluviosa y estación seca.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Generar una muestra representativa de mosquitos de las cuatro regiones endémicas de dengue en Panamá.

Aislar las bacterias endógenas del estómago de *Aedes aegypti*.

Identificar las cepas aisladas.



## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Tipo de Investigacion Observacional

### 5.2 Diseño Descriptivo

### 5.3 Universo

Los mosquitos *Aedes aegypti* de las 4 regiones evaluadas

### 5.4 Area de estudio

El area de estudio esta formada por localidades de las Regiones de Salud de Panama Centro (cinco localidades de la Region Metropolitana de Salud y la Region de San Miguelito) la Region de Panama Oeste (seis localidades) y la Region de Chiriqui (ocho localidades) La seleccion se llevo a cabo usando los registros proporcionados por la Seccion de Estadistica de Vigilancia del MINSA en base a la presencia de las especies de mosquito en estudio y a la prevalencia de casos de dengue y dengue hemorragico

Cabe destacar que se realizo una tercera gira adicional durante la estacion seca en sitios con alto indice de infeccion de la ciudad de Panama

### 5.5 Tiempo de desarrollo del estudio

El estudio durante dos temporadas: seca (verano) y lluviosa (invierno). Se realizaron varias giras a las localidades seleccionadas.

### 5.6 Tamaño de la muestra

La muestra mínima establecida para la elaboración de las pruebas fue de 10 mosquitos hembra vivos por sitio seleccionado de trabajo.

### 5.7 Disecciones

Se evaluó la flora microbiana en los mosquitos *Aedes aegypti* capturados en el campo mediante la cuantificación de la carga bacteriana aerobia y la composición de las especies existentes en el estómago de los mosquitos.

Los mosquitos capturados en el campo fueron identificados y se seleccionaron solo las hembras. Los mosquitos se mantuvieron en frío para garantizar la viabilidad de las bacterias que comprenden el microbioma del insecto. Luego, los mosquitos fueron esterilizados externamente lavándolos delicadamente en alcohol al 70% y seguido de dos lavados en PBS 1X. Todo esto se realizó previo a la disección del estómago y las cabezas del mosquito. Cada estómago fue colocado individualmente en 150 µl de PBS 1X y las cabezas en tubos con RNA later. Estos fueron almacenados en congeladores a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

## 5.8 Cultivos

Se realizó la homogenización de los estómagos en PBS 1X para preparar diluciones seriadas. Las dos últimas diluciones se sembraron en agar nutritivo para así observar el comportamiento bacteriano a las 24 y 48 horas. La densidad y morfología de las colonias fue monitoreada diariamente y se seleccionaron aquellas con características fenotípicas diferentes para su aislamiento en cultivos independientes y su posterior caracterización.

Las bacterias aisladas fueron preservadas utilizando Glicerol y agar LB líquido para ser luego almacenados en congeladores a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 5.9 Identificación de bacterias

### 5.9.1 Extracción de ADN

La cámara de extracción e instrumentos fueron limpiados con cloro al 10% y alcohol al 70% antes de su utilización y al final del proceso.

Se utilizó el Kit de extracción de ADN de columna Qiagen (GmbH Hilden Germany) QIAamp®DNA CAT No 51306. Se siguieron las recomendaciones de manufactura, pero las adaptaciones realizadas fueron: Selección la cepa bacteriana con una asa (volumen de 0.1 µl), incubación a  $56^{\circ}\text{C}$  con proteinasa K toda la noche y elución final utilizamos 250 µl de buffer AE.

### 5.9.2 Protocolo de amplificación de 16S rRNA

Los cebadores para amplificar el gen 16S rRNA están descritos en artículos con excelentes resultados: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG TACGGYTACGCTTGTTACGACT (Crimm et al. 2010; Ramírez et al. 2012). Las condiciones de amplificación se incubó por 2 minutos a  $94^{\circ}\text{C}$ .

luego se realizaron 40 ciclos a 94°C /30 segundos anidamiento a 58°C /30 segundos y extension a 72°C por 1 minuto y una extension final a 72°C durante 10 minutos La amplificacion se realizo en un termociclador Biorad modelo MyCycler™ Thermal Cycler System #1709703

Para la amplificacion del gen 16s rDNA utilizamos el kit de amplificacion de DNA kit Taq PCR master mix Kit (QIAGEN GmbH Hilden Germany)

En la reaccion de amplificacion se utilizaron 13 µl de buffer 10 X 5 µl de agua libre de nucleasas 1µl de cada cebador con una concentracion de 25 µmolar y 5 µl del ADN El volumen final de la amplificacion fue de 25 µl

### 5.9.3 Electroforesis en geles de agarosa

Los productos obtenidos por PCR fueron sometidos a una electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TBE 0.5 X Se utilizo 5 µl del producto amplificado con 3 µl de buffer de corrida (Promega Corporation Madison WI 53711 USA) y se colocan uno por uno en los pocillos del gel Para la corrida se utilizo un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega Corporation Madison WI 53711 USA) como referencia La corrida fue realizada por 1 hora a 90 voltios (V) para la visualizacion del producto se utilizo un fotodocumentador UVP

### 5.9.4 Purificacion de productos de PCR

Todos los amplicones fueron purificados usando el kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH Hilden Germany) siguiendo los pasos de acuerdo a las recomendaciones del fabricante

Adicionalmente se midieron las concentraciones de los purificados con el nanodrop 2000 (Thermo Scientific)

### 5.9.5 Protocolo de secuenciación

En la reacción de secuenciación cebadores para ambas direcciones en una concentración de 5  $\mu\text{M}$  se realiza la secuenciación en reacciones por separado y el kit comercial de PCR con el ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing. Los volúmenes utilizados fueron buffer 3  $\mu\text{l}$ , BigDye 2  $\mu\text{l}$ , Cebador 1  $\mu\text{l}$  y agua libre de nucleasas 11  $\mu\text{l}$  y producto de amplificación purificado 3  $\mu\text{l}$  para un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ .

Se incubó por 5 minutos a 95°C, luego se realizaron 40 ciclos de desnaturalización a 95°C /30 segundos, anidamiento a 50°C /30 segundos y extensión a 60°C por 1 minuto. Por último se incubó a 72°C durante 10 minutos en el termociclador Applied Biosystem.

Se utilizó el secuenciador Applied Biosystems 3130XL (Foster City, CA, USA).

### 5.10 Determinación de la tasa de infección por virus dengue en los mosquitos de campo

#### 5.10.1 Extracción de RNA

Las cabezas de mosquitos se preservaron en preservante de ARN y se mantuvieron congeladas hasta su procesamiento. El protocolo usado para la extracción de ácidos nucleicos involucra el uso de un método de columna RNeasy Extraction kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Previo a la extracción, las cabezas de los mosquitos fueron trituradas utilizando un macerador mecánico. Luego se procedió con los pasos recomendados por el fabricante.

#### 5.10.2 Amplificación de Flavivirus

Para la detección de dengue utilizamos un método probado en el laboratorio de Genómica y publicado previamente (metodología que ha sido aceptada para publicación en Journal of Virology of Methods) (Ortiz et al. 2012).

El protocolo lo utilizado para RT PCR es una amplificación del gen NS5 del para detectar cualquier virus del género Flavivirus y utilizando enzimas de restricción podemos observar diferentes patrones para cada serotipo de dengue

#### 5.15 Curvas de crecimiento bacteriano

Evaluación de las bacterias de campo y su curva de crecimiento durante horas en agar LB se realizó cultivo bacteriano y midiendo la OD (Densidad Óptica) a través del tiempo se evaluó su comportamiento y se estimó el tiempo de crecimiento óptimo

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Numero de Mosquitos y bacterias aislados

|                         | Mosquitos Procesados por Localidad |               |          |          |           |       |
|-------------------------|------------------------------------|---------------|----------|----------|-----------|-------|
| Especie                 | Juan Diaz                          | San Miguelito | Chorrera | Chiriqui | Rio Abajo | Total |
| <i>Aedes aegypti</i>    | 7                                  | 30            | 37       | 28       | 32        | 134   |
| <i>Aedes albopictus</i> | 8                                  | 7             | 1        | 34       | 0         | 50    |

**Cuadro I** Cuantificacion mosquitos procesados en la estacion segunda gira en estacion lluviosa

|                         | Bacterias aisladas |               |          |          |           |       |
|-------------------------|--------------------|---------------|----------|----------|-----------|-------|
| Especie                 | Juan Diaz          | San Miguelito | Chorrera | Chiriqui | Rio Abajo | Total |
| <i>Aedes aegypti</i>    | 1                  | 6             | 15       | 12       | 7         | 41    |
| <i>Aedes albopictus</i> | 0                  | 6             | 0        | 10       | 5         | 21    |

**Cuadro II** Bacterias aisladas en la gira de estacion lluviosa

|                         | Mosquitos Procesados por Localidad |               |          |          |       |
|-------------------------|------------------------------------|---------------|----------|----------|-------|
| Especie                 | Rio Abajo                          | San Miguelito | Chorrera | Chiriqui | Total |
| <i>Aedes aegypti</i>    | 10                                 | 13            | 20       | 6        | 49    |
| <i>Aedes albopictus</i> | 0                                  | 2             | 0        | 2        | 4     |

**Cuadro III** Cuantificacion de mosquitos procesados en la estacion seca

|                         | <b>Bacterias aisladas</b> |                      |                 |                 |              |
|-------------------------|---------------------------|----------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| <b>Especie</b>          | <b>Rio Abajo</b>          | <b>San Miguelito</b> | <b>Chorrera</b> | <b>Chiriqui</b> | <b>Total</b> |
| <i>Aedes aegypti</i>    | 16                        | 4                    | 1               | 11              | 32           |
| <i>Aedes albopictus</i> | 0                         | 2                    | 0               | 2               | 4            |

**Cuadro IV Bacterias aisladas en la gira de estacion seca**

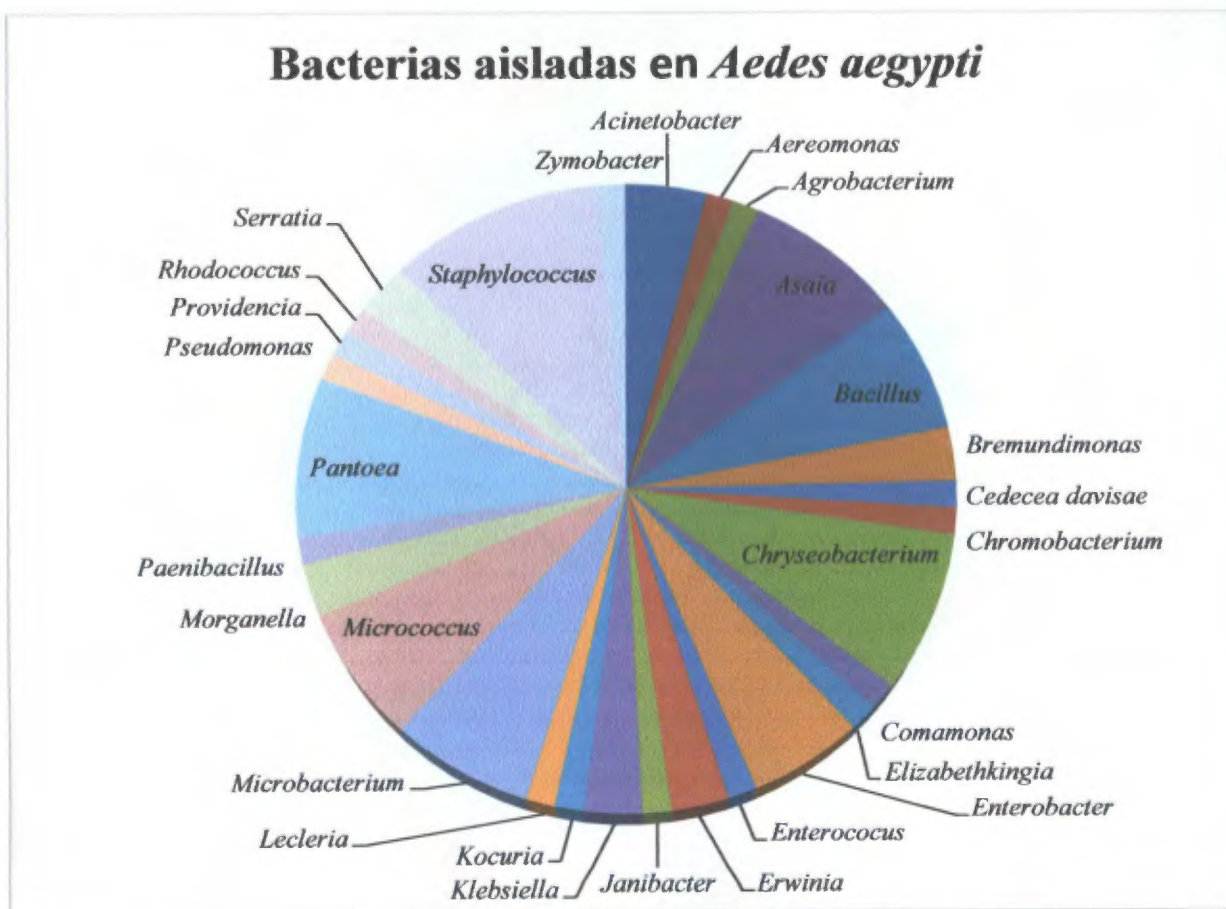


**Cuadro V** Generos aislados en *Aedes aegypti*, segun las estaciones lluviosa y seca durante el estudio

| <b>Bacterias aisladas</b> | <b>Estacion lluviosa</b> | <b>Estacion seca</b> |
|---------------------------|--------------------------|----------------------|
| <i>Acinetobacter</i>      | 0                        | 3                    |
| <i>Aereomonas</i>         | 1                        | 0                    |
| <i>Agrobacterium</i>      | 1                        | 0                    |
| <i>Asaia</i>              | 5                        | 1                    |
| <i>Bacillus</i>           | 4                        | 1                    |
| <i>Bremundimonas</i>      | 1                        | 1                    |
| <i>Cedecea davisae</i>    | 1                        | 0                    |
| <i>Chromobacterium</i>    | 0                        | 1                    |
| <i>Chryseobacterium</i>   | 4                        | 2                    |
| <i>Comamonas</i>          | 0                        | 1                    |
| <i>Elizabethkingia</i>    | 1                        | 0                    |
| <i>Enterobacter</i>       | 4                        | 0                    |
| <i>Enterococcus</i>       | 1                        | 0                    |
| <i>Erwinia</i>            | 1                        | 1                    |
| <i>Jambacter</i>          | 0                        | 1                    |
| <i>Klebsiella</i>         | 2                        | 0                    |
| <i>Kocuria</i>            | 0                        | 1                    |
| <i>Lecleria</i>           | 1                        | 0                    |
| <i>Microbacterium</i>     | 0                        | 3                    |
| <i>Micrococcus</i>        | 1                        | 4                    |
| <i>Morganella</i>         | 2                        | 0                    |
| <i>Paenibacillus</i>      | 1                        | 0                    |
| <i>Pantoea</i>            | 3                        | 3                    |
| <i>Providencia</i>        | 1                        | 0                    |
| <i>Pseudomonas</i>        | 0                        | 1                    |
| <i>Rhodococcus</i>        | 1                        | 0                    |
| <i>Serratia</i>           | 1                        | 1                    |
| <i>Staphylococcus</i>     | 3                        | 5                    |
| <i>Zymobacter</i>         | 1                        | 0                    |

## 6.2 Cantidad de bacterias en *Aedes aegypti*:

Se aislaron 84 de *Aedes aegypti* esas 73 se lograron caracterizar y 11 no se logró la amplificación eficiente.



**Fig 15.** Géneros encontrados en *Aedes aegypti* durante el estudio

**Cuadro VI Generos encontrados en *Aedes aegypti***

| <b>Generos encontrados</b>         | <b>Tincion Gram</b> |
|------------------------------------|---------------------|
| <i>Acinetobacter</i>               | Gram negativa       |
| <i>Aereomonas</i>                  | Gram negativa       |
| <i>Agrobacterium rhizobium</i>     | Gram negativa       |
| <i>Asaia</i>                       | Gram negativa       |
| <i>Bacillus</i>                    | Gram positiva       |
| <i>Brevundimonas</i>               | Gram negativa       |
| <i>Cedecea davisae</i>             | Gram negativa       |
| <i>Chromobacterium</i>             | Gram negativa       |
| <i>Chryseobacterium</i>            | Gram negativa       |
| <i>Comamonas</i>                   | Gram negativa       |
| <i>Elizabethkingia</i>             | Gram negativa       |
| <i>Enterobacter</i>                | Gram negativa       |
| <i>Enterococcus</i>                | Gram negativa       |
| <i>Erwinia</i>                     | Gram negativa       |
| <i>Janibacter</i>                  | Gram negativa       |
| <i>Klebsiella</i>                  | Gram negativa       |
| <i>Kocuria</i>                     | Gram negativa       |
| <i>Lecleria</i>                    | Gram negativa       |
| <i>Microbacterium</i>              | Gram negativa       |
| <i>Micrococcus</i>                 | Gram negativa       |
| <i>Morganella</i>                  | Gram negativa       |
| <i>Paenibacillus illinoisensis</i> | Gram positiva       |
| <i>Pantoea</i>                     | Gram negativa       |
| <i>Providencia</i>                 | Gram negativa       |
| <i>Serratia marcescens</i>         | Gram negativa       |
| <i>Staphylococcus</i>              | Gram positiva       |
| <i>Zymobacter palmae</i>           | Gram negativa       |

### 6.3 Bacterias para la estación lluviosa:

Durante la estación lluviosa logramos aislar 41 cepas bacterianas. El género predominante fue *Asaia* (5 cepas), *Bacillus*, mientras que *Chryseobacterium*, *Enterobacter* (4 cepas) y *Pantonea* (3 cepas).

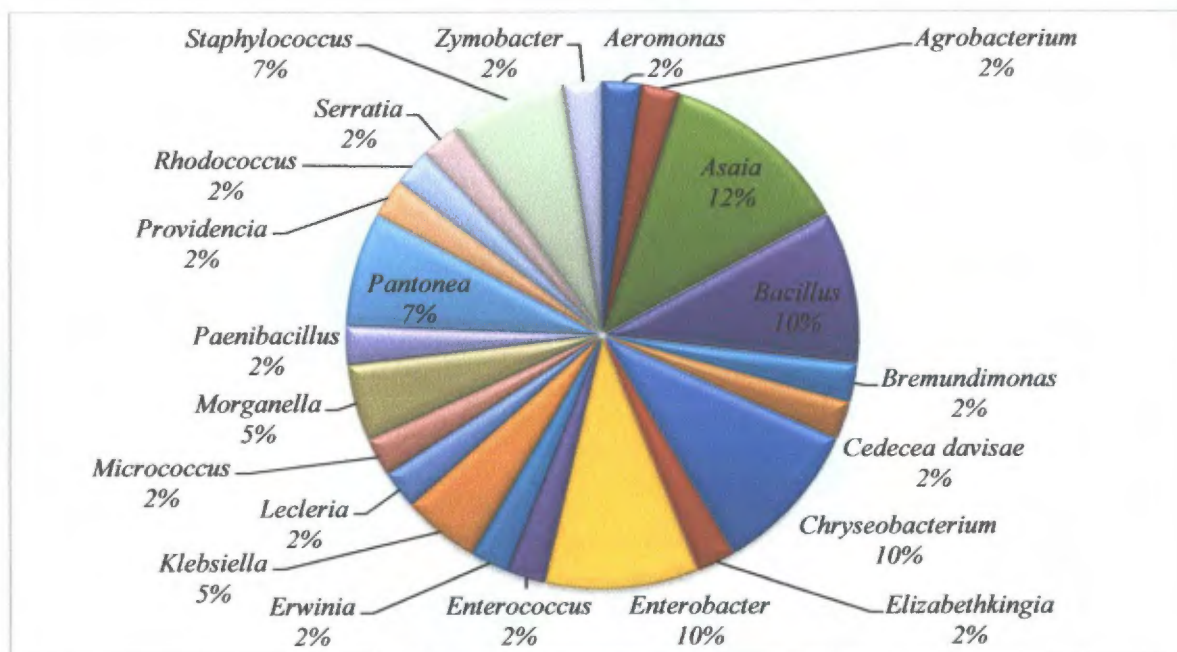


Fig 16. Géneros encontrados en *Aedes aegypti* durante la estación lluviosa

### 6.4 Bacterias para la estación seca:

Para estación seca logramos aislar 32 cepas bacterianas. El género predominante fue *Staphylococcus* (5 cepas) y *Microbacterium* (5 cepas), *Micrococcus* (4 cepas), seguido *Acinetobacter* (3 cepas).

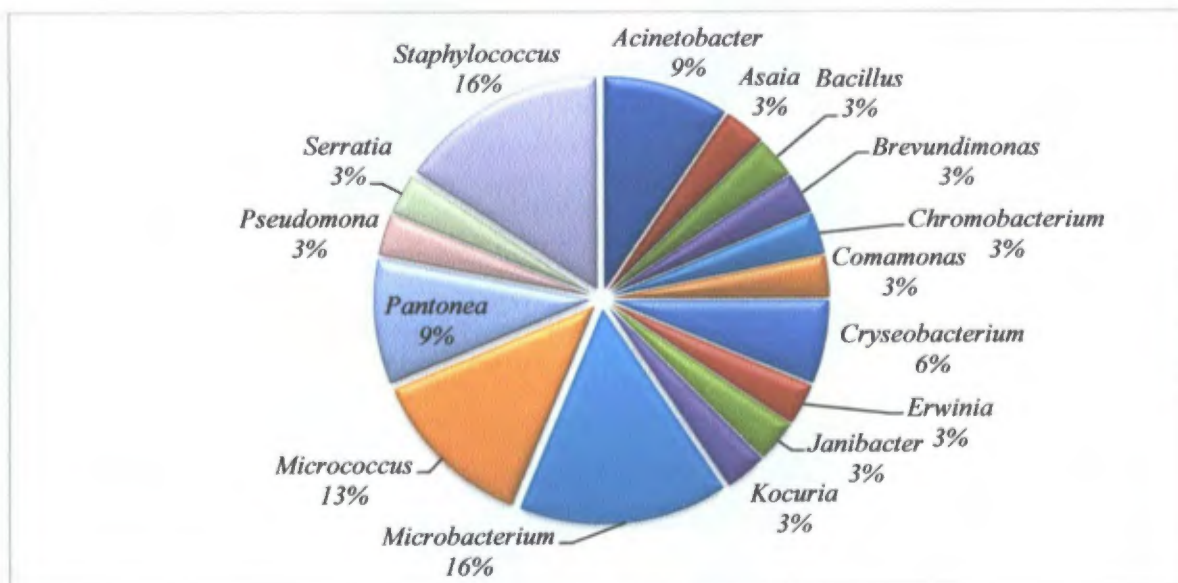


Fig 17. Géneros encontrados en *Aedes aegypti* durante la estación seca

### 6.5 Microbioma de *Aedes albopictus*

Para el aprovechamiento de los recursos también hicimos identificación de las bacterias en *Aedes albopictus* un total de 25 bacterias fueron caracterizadas, 5 bacterias aisladas no se lograron caracterizar.

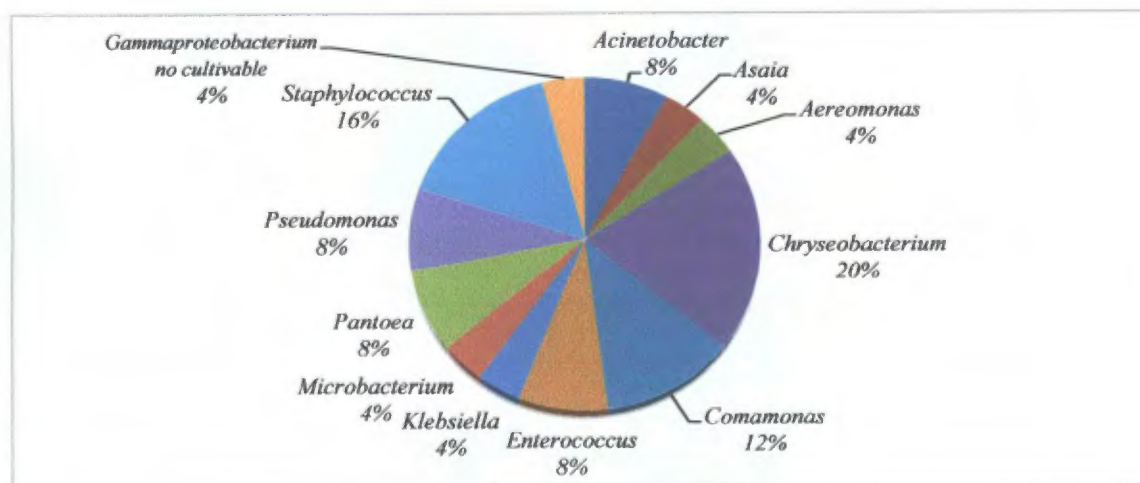
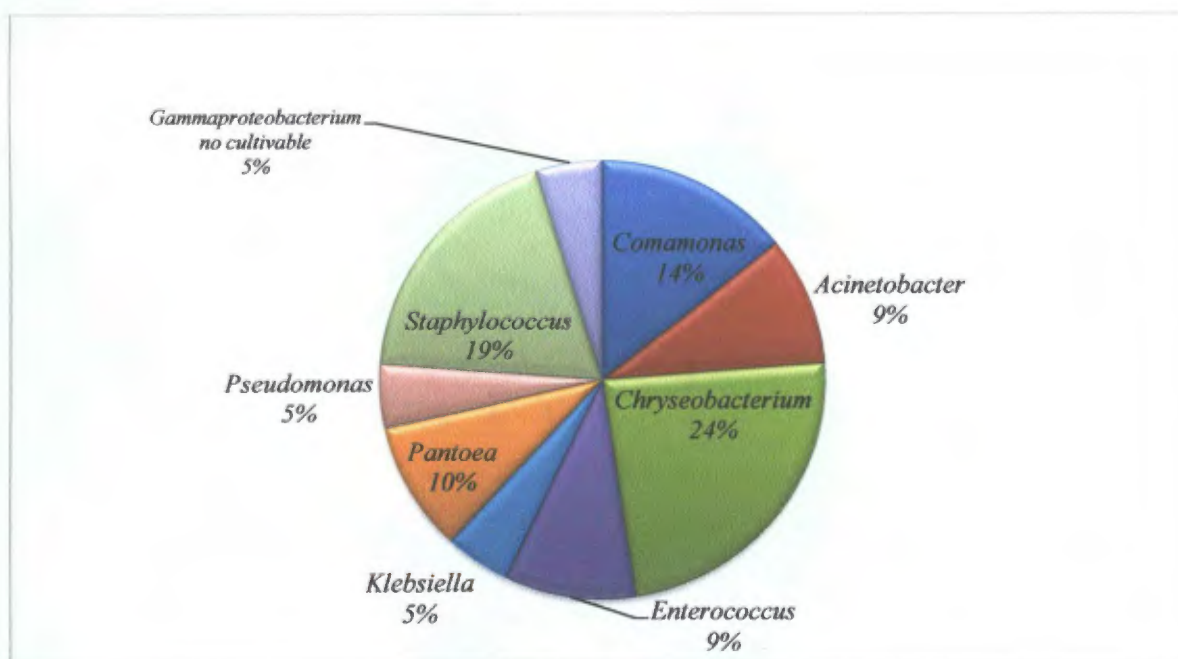


Fig 18. Géneros encontrados en *Aedes albopictus* durante el estudio



Cuadro VII. Géneros encontrados en *Aedes albopictus*

| Géneros encontrados                       | Gram          |
|---|---------------|
| <i>Acinetobacter</i>                      | Gram negativa |
| <i>Aereomonas</i>                         | Gram negativa |
| <i>Asaia</i>                              | Gram negativa |
| <i>Chryseobacterium</i>                   | Gram negativa |
| <i>Comamonas</i>                          | Gram negativa |
| <i>Enterococcus</i>                       | Gram negativa |
| <i>Klebsiella</i>                         | Gram negativa |
| <i>Microbacterium</i>                     | Gram negativa |
| <i>Pantonea</i>                           | Gram negativa |
| <i>Pseudomonas</i>                        | Gram negativa |
| <i>Staphylococcus</i>                     | Gram positiva |
| <i>Gammaproteobacterium no cultivable</i> | Gram negativa |

6.6 Bacterias aisladas en estación lluviosa para *Aedes albopictus*:Fig 19. Géneros encontrados en *Aedes albopictus* durante la estación lluviosa

Los resultados demostraron que para *Aedes albopictus* el genero *Chryseobacterium* fue la predominante seguida de *Comamonas* y *Staphylococcus*

#### 6.7 Bacterias aisladas en estacion seca para *Aedes albopictus*

En *Aedes albopictus* las colectas fueron un poco bajas ya que no logramos realizar colecta en todos los sitios por lo que la representatividad numerica es poca

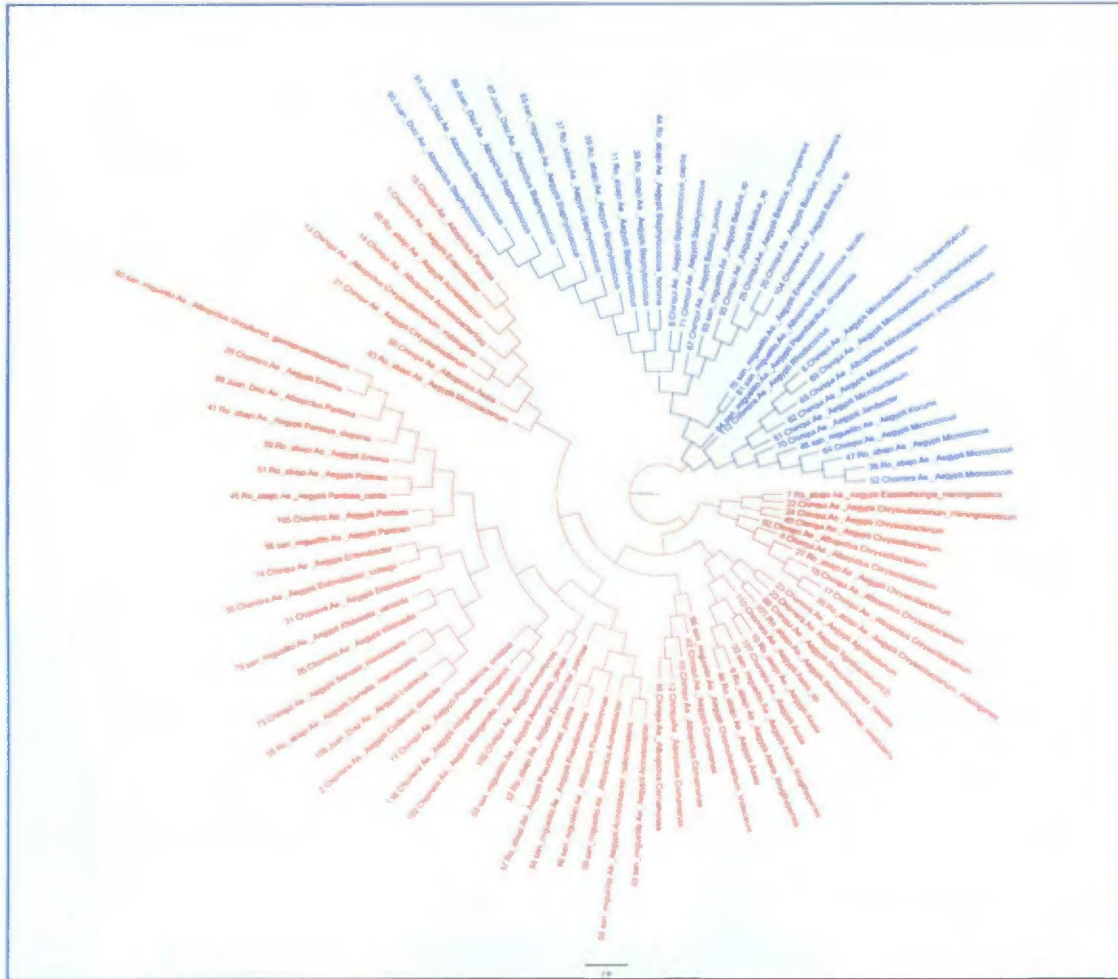
| Genero aislado        | Cantidad |
|-----------------------|----------|
| <i>Asaia</i>          | 1        |
| <i>Aereomonas</i>     | 1        |
| <i>Pseudomonas</i>    | 1        |
| <i>Microbacterium</i> | 1        |

**Cuadro VIII** Generos encontrados en *Aedes albopictus* en la estacion seca



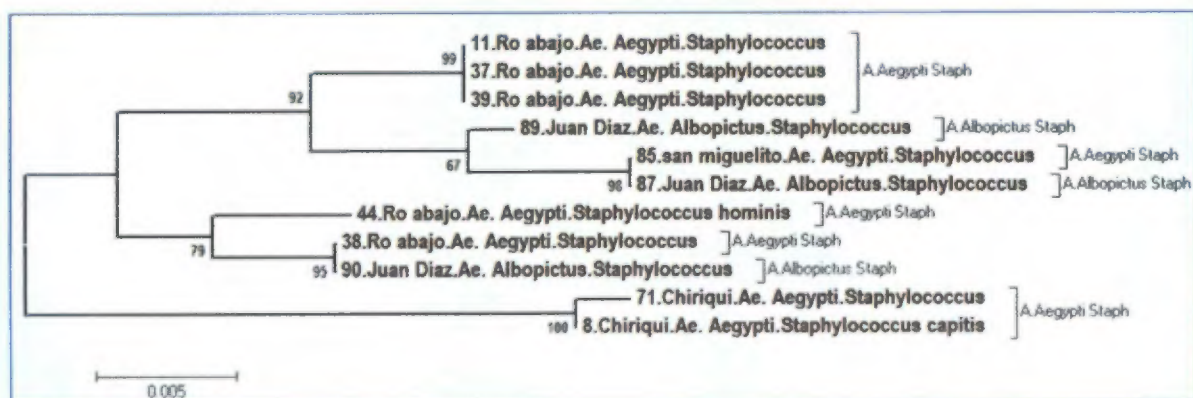
## 6.8 Análisis filogenético

### 6.8.1 Análisis por localización geográfica y tipo de bacteria gram positiva y gram negativa.



**Fig 20. Árbol Filogenético de las bacterias aisladas:** utilizando el programa Neighbor joining a partir del alineamiento de las secuencias 16rs RNA, las bacterias azules corresponden al grupo Gram positivo mientras que el grupo de bacterias en color rojo las Gram negativa.

### 6.8.2 Comparación filogenética entre cepas *Staphylococcus* y *Chryseobacterium*



aislados

Fig 21. Árbol filogenético de los *Staphylococcus* aislados de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*: Utilizando el programa Neighbor joining se compararon las cepas aisladas.

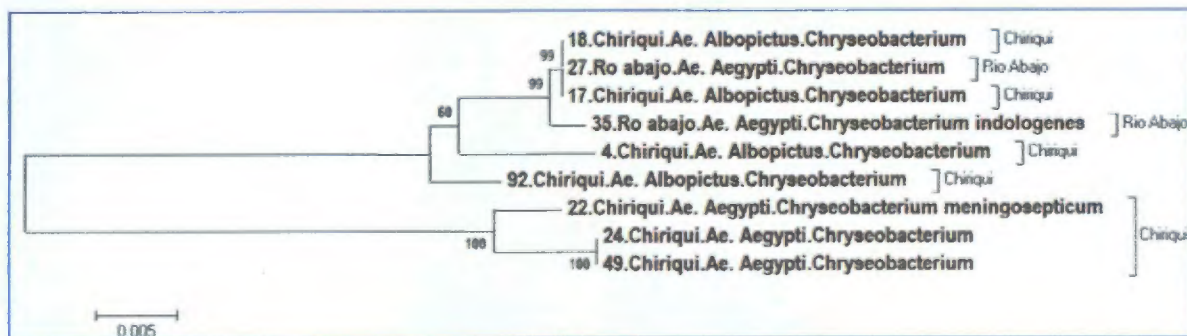
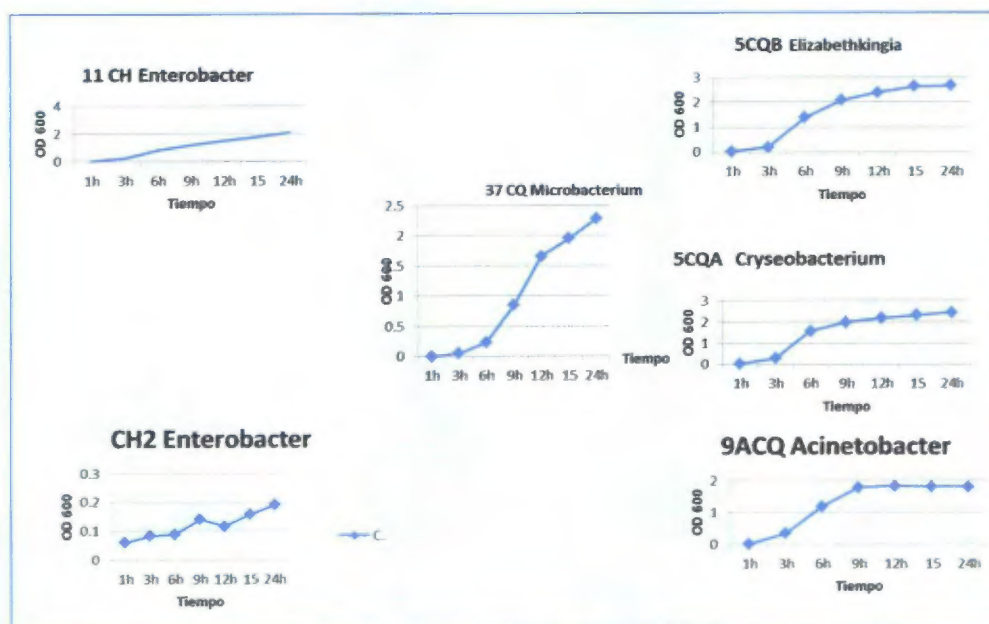


Fig 22. Árbol filogenético *Chryseobacterium* aislados de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*: Utilizando el programa Neighbor joining se compararon las cepas aisladas.

### 6.9 Detección de virus dengue en las cabezas de mosquitos

Todas las muestras de las cabezas de mosquitos procesadas individualmente dieron negativo a la RT-PCR para Flavivirus.

### 6.10 Curvas de crecimiento



**Fig 23. Curvas de crecimiento: bacterias evaluadas a través del tiempo para seguir su crecimiento.**

### 6.10.1 *Enterobacter*

*Enterobacter* fue la bacteria que demostró tener mejor el mejor tiempo de replicación para hacer las pruebas in vivo con mosquitos en controlar la infección por dengue.

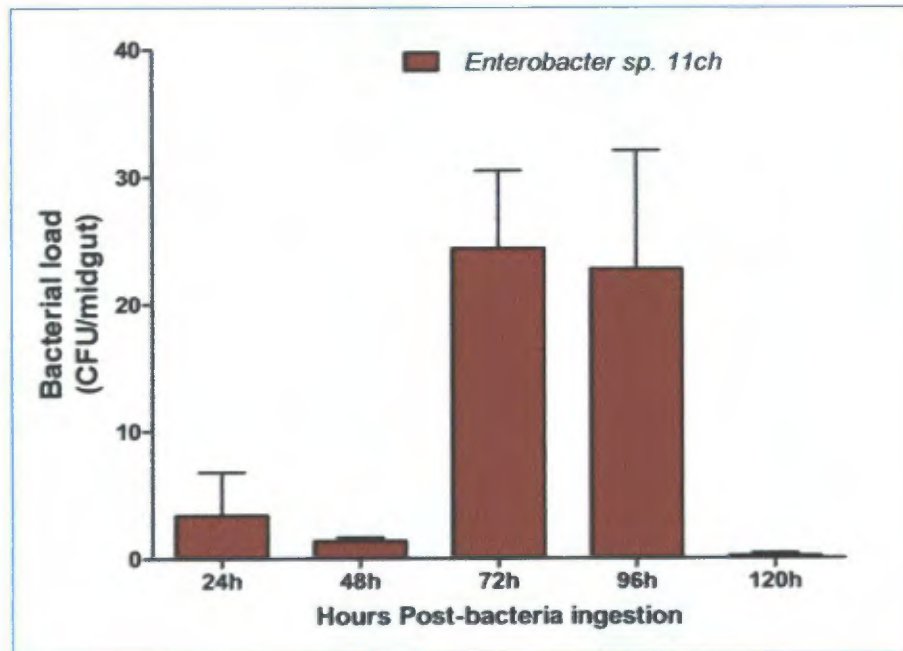


Fig24. Representación gráfica del tiempo de replicación luego de la ingestión con la Bacteria *Enterobacter*

## 7 DISCUSION

El virus dengue es un arbovirus transmitido por los vectores *Ae aegypti* y *Ae albopictus* que ha tomado mayor importancia debido al aumento de casos y su relacion directa con las actividades humanas como la urbanizacion migracion la escases de recursos hidricos y posiblemente el cambio ambiental que tambien podria estar ocasionando un mayor riesgo de padecer estas enfermedades (Bhatt et al 2013)(Sutherst 2004)

El estudio de los mosquitos ha permitido el surgimiento de estrategias innovadoras para el control de vectores un ejemplo es la utilizacion de la bacteria *Wolbachia* Programas internacionales financiados impulsan el uso el *Wolbachia* como alternativa para el control de mosquitos vectores La liberacion programada de mosquitos portadores de esta bacteria que bloquea parcialmente la trasmision del virus Dengue sin afectar al mosquito La cepa wMel confiere proteccion contra el virus Chikungunya (CHIKV) y el virus de la fiebre amarilla (YFV) en *Ae aegypti* y ultimos reportes demuestran que puede ser efectiva contra el virus Zika (Aliota et al 2016)

Conocer el microbioma existente en los vectores circulantes en nuestro pais permitiria reconocer potenciales bacterias para disminuir la infeccion extrinseca del virus dengue dentro del insecto (Ricci Valzano et al 2012)

Para este estudio elegimos lugares con alto indice de infestacion de mosquitos *Ae aegypti* en diferentes regiones de Panama Dentro del recorrido se decidio incluir tambien mosquitos *Ae albopictus* de dichas areas en el analisis



En total se aislaron 114 cepas para *Ae aegypti* y *Ae albopictus* con características morfológicas distintas. La identificación exitosamente 98 bacterias entre ellas se observó un predominio de bacterias Gram negativas situación similar a lo observado en otras especies de mosquitos e insectos (Dong et al 2009a)(Moran and Baumann 2000)

Un total de 73 aislamientos bacterianos fueron caracterizados de *Ae aegypti* con una distribución filogenética de 52.5% Proteobacterias 21.90% Firmicutes 16.4% Actinobacteria, 9.5% Bacteroidetes. Estudios previos ya habían descrito la presencia de estas bacterias lo que refuerza la coexistencia de estos mismos microorganismos en mosquitos de campo (Ramirez et al 2012)

Para *Ae albopictus* sería la primera vez en Panamá que se describe las poblaciones bacterianas en el intestino medio de estos mosquitos. Se caracterizaron 25 bacterias siendo su distribución filogenética la siguiente 52% Proteobacterias 24% Flavobacterias 20% Firmicutes y 4% Actinobacterias bacterias ya descritas en estudios previos (Valiente Moro et al 2013)

*Ae aegypti* presentó una carga microbiana muy heterogénea, durante el verano e invierno logramos obtener seis géneros predominantes Gammaproteobacterias el género *Pantoea* 8.2% Alphaproteobacterias *Asaia* con 8.2% Flavobacterias *Chryseobacterium* 8.2% *Bacillus* *Staphylococcus* 15% similar a lo descrito en estudios previos (Desiely S Gusmão et al 2010 Ramirez et al 2012) (Yun et al 2014)

En las dos estaciones se mostró la presencia de los géneros *Asaia* *Bacillus* *Brevundimonas* *Erwinia* *Pantoea* *Serratia* *Staphylococcus*. Además encontramos la coexistencia de bacterias en los mosquitos capturados *Enterobacter* *Cedecea* *Bacillus* *Chryseobacterium* *Staphylococcus* *Acinetobacter* *Serratia* *Erwinia* *Paenibacillus* *Staphylococcus* *Enterococcus* *Micrococcus* *Comamonas* *Chryseobacterium* lo que es muy interesante pues existen registros que la comunidad microbiana trabaja en sinergia (Rio Hu and Aksoy 2004)

*Ae albopictus* presento 12 diferentes generos siendo *Chryseobacterium* el predominante en un 20% *Staphylococcus* 16 % *Comamonas* 12% (Valiente Moro et al 2013)

Hemos encontrado una diversidad heterogenea de bacterias aisladas de mosquitos *Ae aegypti* con una prevalencia de un 11 % de *Staphylococcus* y 8% de *Chryseobacterium* En comparacion con *Ae albopictus* tenemos una prevalencia de un 16% para *Staphylococcus* y 20% para *Chryseobacterium* por ello se realizo una comparacion filogenetica de estas bacterias

El analisis filogenetico no mostro diferencias entre bacterias aisladas de mosquitos *Ae aegypti* y *Ae albopictus* esto una distribucion compartida, el uso de los mismos recursos para alimentarse y la utilizacion de los mismos sitios de reposo Esto explicaria las teorias de que *Ae albopictus* se expande cada vez mas y esta coexistiendo activamente en Panama (Kraemer et al 2015)

*Staphylococcus* muestra 2 subgrupos uno aislado de la ciudad y el otro de Chiriqui lo que es muy interesante pues se presentan clados bien definidos a pesar de ser estos sitios muy distantes Por otro lado *Chryseobacterium* tuvo una prevalencia alta en los mosquitos que fueron colectados en Chiriqui esta bacteria ha sido muy estudiada en otros insectos y se encuentra comunmente en cualquier fase del mosquito (Coon et al 2015)

Se eligieron 12 cepas bacterianas aisladas para realizar curvas de crecimiento y solo 6 cepas *Microbacterium* *Acinetobacter* *Chryseobacterium* *Elizabethkingia* y 2 cepas de *Enterobacter* (11ch y Ch2) demostraron tener un crecimiento exponencial en las primeras horas para los experimentos

Nuestros resultados muestran una alta diversidad microbiana durante las dos estaciones lluviosa y seca en las hembras adultas de *Ae aegypti* y *Ae albopictus* información necesaria para el uso eventual de estos organismos como medida de control Esta medida tendria mejor aceptacion porque no se modifica geneticamente al insecto (Rio et al 2004) incluso el uso de bacterias



(simbiontes) seria mas facil que introducir transgenes y posiblemente reduciria el costo para desarrollar un plan a gran escala de biocontrol (Ricci Valzano et al 2012)

Observamos que la deteccion del virus dengue en las cabezas de los mosquitos fue negativa, asumimos que esto se debe a que la carga viral es muy baja individualmente Una opcion para mejorar la sensibilidad de la detección seria realizar la determinacion del virus en grupos de 10 o mas mosquitos a la vez Alternativamente se podrian implementar metodos mas sensibles por ejemplo el uso de PCR digital (Jones et al 2016)

## 8 CONCLUSIONES

- Los vectores han desarrollado una viable adaptacion ecologica por lo que el estudio del microbioma es una excelente evidencia que podemos encontrar bacterias potenciales para contrarrestar el efecto de los patogenos en su sistema inmune o que potencien la respuesta
- El mosquito *Aedes aegypti* presento durante las estaciones seca y lluviosa una alta heterogeneidad. Los resultados indican que las estaciones no tienen un efecto con el tipo de microbioma. Debido a que encontramos generos presentes en ambas estaciones: *Asaia*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Erwinia*, *Pantonea*, *Serratia*, *Staphylococcus*.
- Los resultados demostraron que el filo predominante para *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* fue Proteobacterias.
- Analizando los arboles filogeneticos de las bacterias aisladas y organizadas por bacterias gram positivas y gram negativas, no existe una asociacion especifica en cuanto al lugar geografico.
- El arbol filogenetico *Staphylococcus* aislados de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* se logro ver dos clados claramente definidos para los *Staphylococcus* aislados del area metropolitana con los aislados de la provincia Chiriqui. Sin embargo, analisis filogeneticos de *Chryseobacterium* no mostro diferencias significativas demostrando su amplia distribucion en el pais.

- Las bacterias encontradas crecen aerobicamente y en medio de cultivo nutritivo dependiente. La utilizacion de secuenciacion masiva ayudaria a tener un panorama de otros generos que no tienen la capacidad de crecer en los medios de cultivos que utilizamos en el laboratorio.
- No logramos detectar virus Dengue o algun virus de la familia de los Flavivirus en las cabezas de los mosquitos. el siguiente paso seria utilizar metodos mas sensibles.

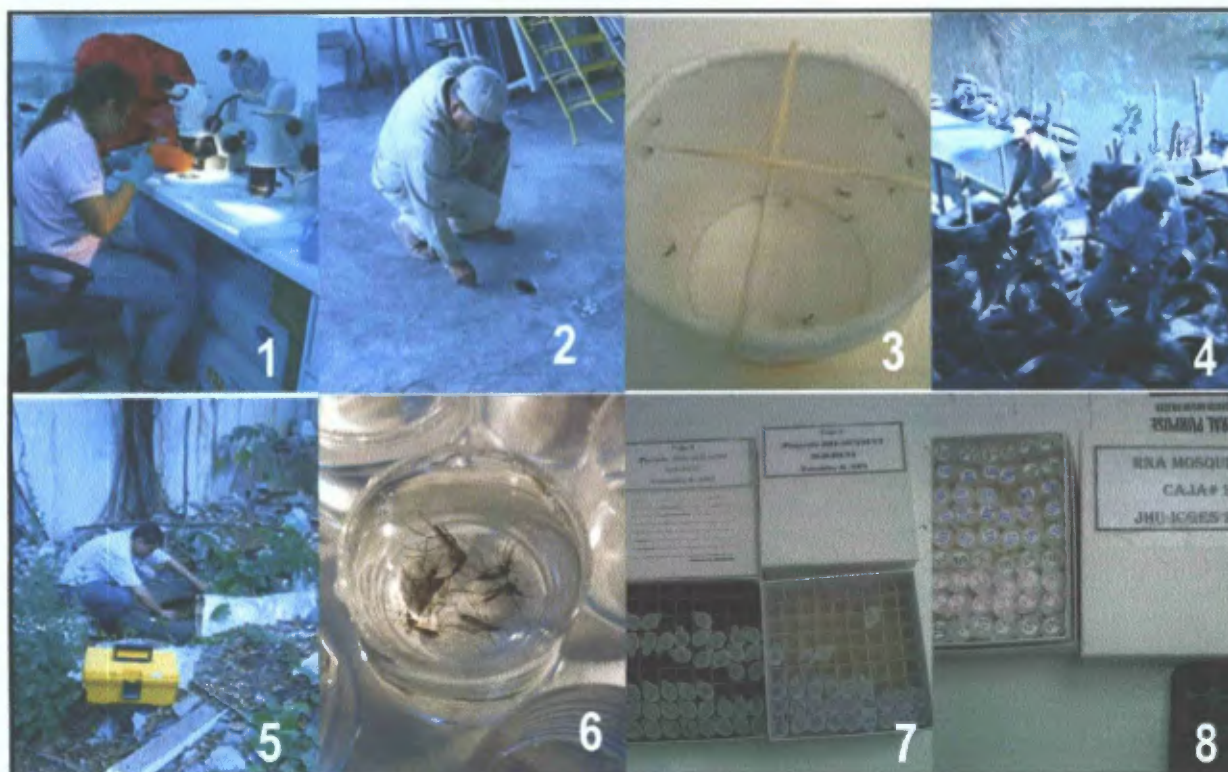
## 9 RECOMENDACIONES

- Utilizacion de meta genomica para lograr detectar bacteria no cultivables con los medios convencionales
- Utilizar otros genes para identificacion de microbioma como 18s rRNA
- El analisis de los mosquitos para deteccion de virus el ideal seria realizarlo en grupos de 10 o mas mosquitos Para garantizar cobertura probablemente la mejor forma de analizar seria hacer dos capturas para evaluaciones independientes
- Utilizacion de PCR digital para mejorar la sensibilidad de la deteccion del dengue individualmente en los mosquitos

## 10. ANEXOS

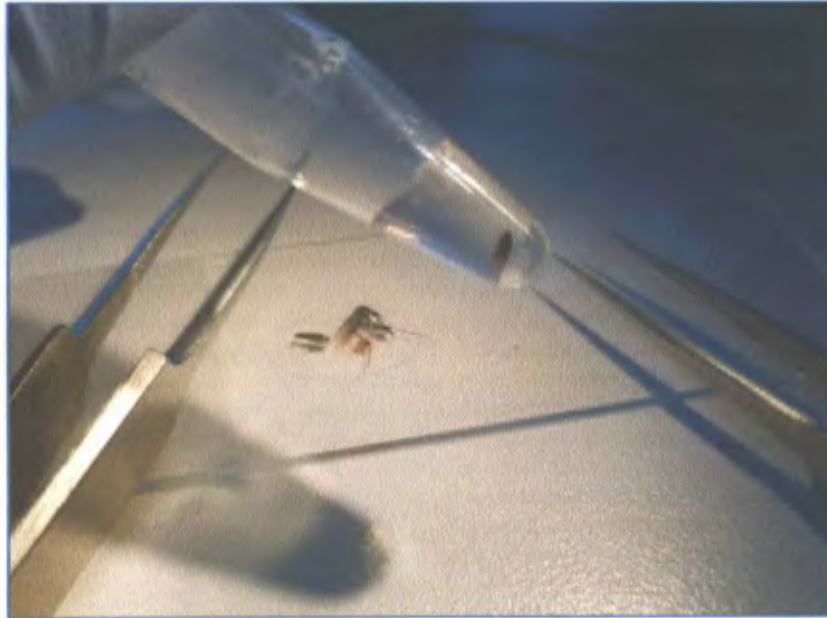
### 10.2 Procedimientos

#### 10.2.1 Giras en campo

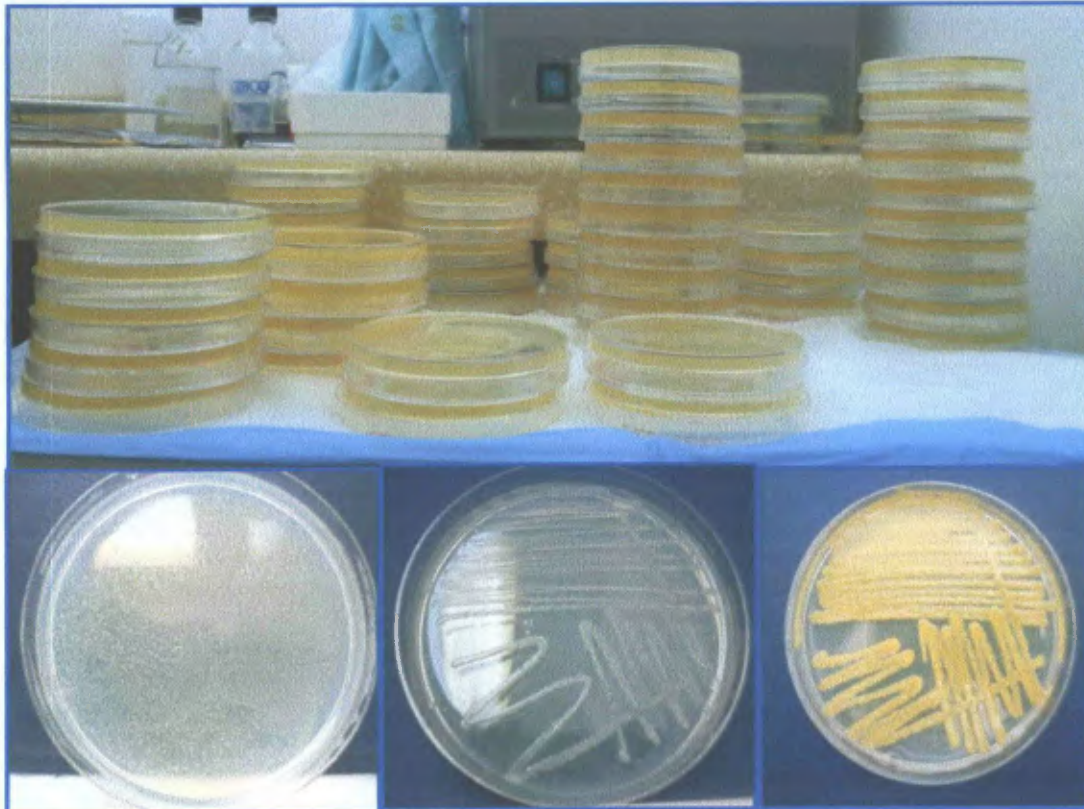


1. Trabajo de disecciones en el laboratorio
2. Gira de recolecta de material biológico en Río Abajo
3. Mosquitos recolectados
4. Gira en un sitio de riesgo con depósitos de aguas en Chiriquí
5. Colección de estadios inmaduros en un punto de riesgo en San Miguelito
6. Lavado de mosquitos en PBS para realizar las disecciones
7. ADN extraídos de Bacterias
8. ARN extraído de las cabezas de los mosquitos.

### 10.2.2. Disecciones del intestino medio

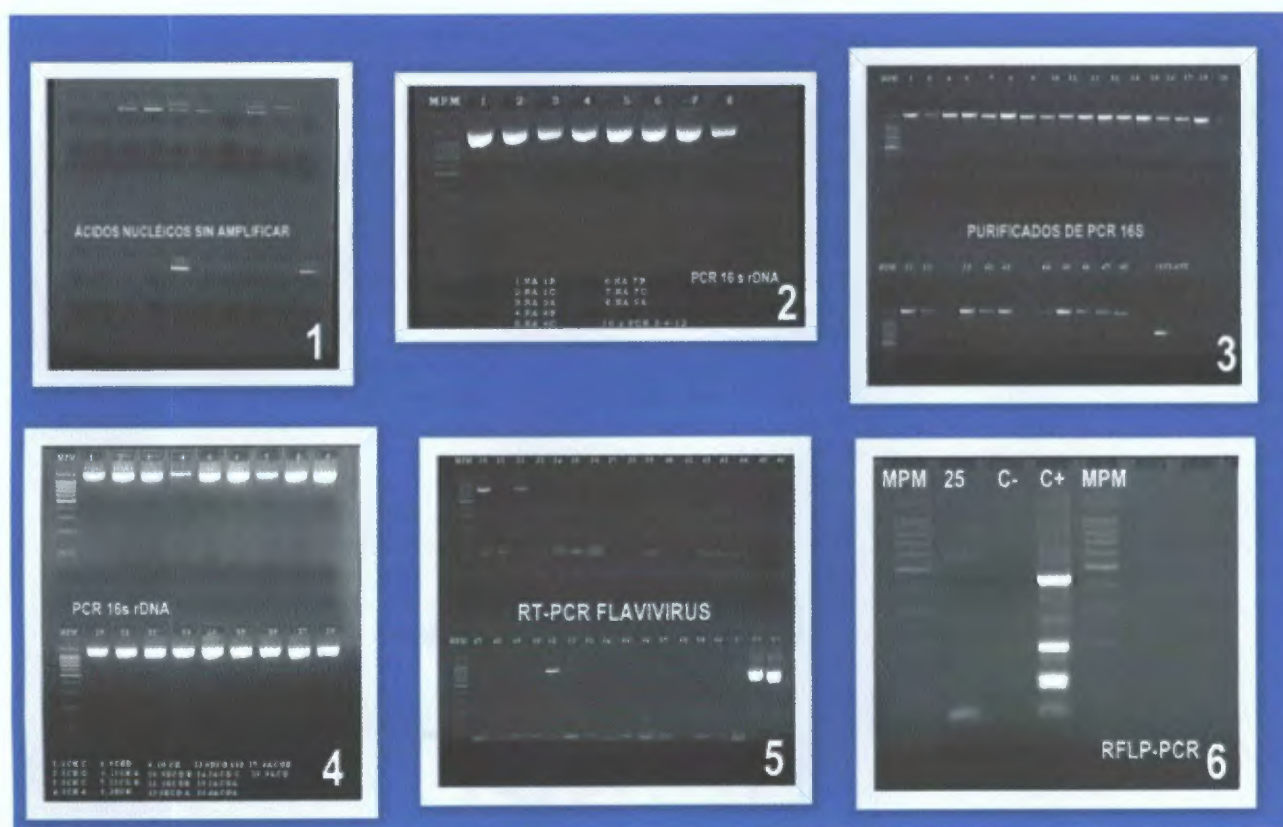


### 10.2.3 Cultivos bacterianos





## 10.2.5 Detección de ácidos nucleicos



Fotos de detección: 1. Detección de ácidos nucleicos 2. Detección de la amplificación del gen 16s rDNA de bacterias 3. Purificación de productos para secuenciación 4. Detección de la amplificación del gen 16s rDNA 5. Detección de la amplificación de RT-PCR para Flavivirus 6. Detección del corte con enzima de restricción para la Dengue.



#### 10.2.4 Almacenaje de cepas y conservación de cabezas de los mosquitos



## 10.3 Artículos científicos publicados

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS NEGLECTED  
TROPICAL DISEASES

## Reciprocal Tripartite Interactions between the *Aedes aegypti* Midgut Microbiota, Innate Immune System and Dengue Virus Influences Vector Competence

Jose Luis Ramirez<sup>1</sup>, Jayme Souza-Neto<sup>2\*</sup>, Rolando Torres Cosme<sup>2</sup>, Jose Rovira<sup>2</sup>, Alma Ortiz<sup>2</sup>, Juan M. Pascale<sup>2</sup>, George Dimopoulos<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> W. Harry Feinstone Department of Molecular Microbiology and Immunology, Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, United States of America, <sup>2</sup> Gorgas Memorial Institute for Health Research, Panama City, Panama

### Abstract

Dengue virus is one of the most important arboviral pathogens and the causative agent of dengue fever, dengue hemorrhagic fever, and dengue shock syndrome. It is transmitted between humans by the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, and at least 2.5 billion people are at daily risk of infection. During their lifecycle, mosquitoes are exposed to a variety of microbes, some of which are needed for their successful development into adulthood. However, recent studies have suggested that the adult mosquito's midgut microflora is critical in influencing the transmission of human pathogens. In this study we assessed the reciprocal interactions between the mosquito's midgut microbiota and dengue virus infection that are, to a large extent, mediated by the mosquito's innate immune system. We observed a marked decrease in susceptibility to dengue virus infection when mosquitoes harbored certain field-derived bacterial isolates in their midgut. Transcript abundance analysis of selected antimicrobial peptide genes suggested that the mosquito's microbiota elicits a basal immune activity that appears to act against dengue virus infection. Conversely, the elicitation of the mosquito immune response by dengue virus infection itself influences the microbial load of the mosquito midgut. In sum, we show that the mosquito's microbiota influences dengue virus infection of the mosquito which in turn activates its antibacterial



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jviromet](http://www.elsevier.com/locate/jviromet)

## Simple, specific molecular typing of dengue virus isolates using one-step RT-PCR and restriction fragment length polymorphism

Alma Ortiz<sup>a,b,1</sup>, Zeuz Capitan<sup>a,1</sup>, Yaxelis Mendoza<sup>a,1</sup>, Julio Cisneros<sup>a,1</sup>, Brechla Moreno<sup>a,1</sup>, Yamitzel Zaldivar<sup>a,1</sup>, Mariana Garcia<sup>a,1</sup>, Rebecca E. Smith<sup>a,1</sup>, Jorge Motta<sup>a,1</sup>, Juan Miguel Pascale<sup>a,b,c,s,2</sup>

<sup>a</sup> Gorgas Memorial Institute for Health Studies, Panama City, Panama

<sup>b</sup> MSc Program in Biotechnology, University of Panama, Panama City, Panama

<sup>c</sup> School of Medicine, University of Panama, Panama City, Panama

### Article history:

Received 26 October 2011

Received in revised form 3 June 2012

Accepted 12 June 2012

Available online xxx

### Keywords:

Dengue

Flavivirus

Panama

### ABSTRACT

A one-step RT-PCR and one-enzyme RFLP was used to detect and distinguish among flaviviruses, including the four serotypes of dengue and the St. Louis Encephalitis, West Nile and Yellow Fever viruses in cultured virus samples or acute-phase human serum. Using a previously described RT-PCR, but novel RFLP procedure, results are obtained in 24 h with basic PCR and electrophoresis equipment. There is 95% agreement between RT-PCR/RFLP results and those achieved by indirect immunofluorescence assays, and 100% agreement between RT-PCR/RFLP results and gene sequencing. This method is more rapid than tests of cytopathic effect based on virus isolation in tissue culture, and simpler than real-time PCR. It does not require specialized equipment, radioisotopes or computer analysis and is a method that can be applied widely in the developing world. It allows for prompt determination of whether a flavivirus is (b

#### 10.4 Presentaciones y carteles:



nes de *Aedes aegypti* de Centroamérica.

Lorenzo Cáceres

a. 10- Correlacionando la microfiora con la presencia del virus del Dengue *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en áreas endémicas de Panamá. A Ortiz, JL Ramirez, R Torres, J Rovira, J Castillo, JM Pascale, G Dimopoulos



## 12 BIBLIOGRAFIA

- Alphay Luke 2009 'Natural and Engineered Mosquito Immunity' *Journal of Biology*
- Arca Bruno et al 2005 'An Updated Catalogue of Salivary Gland Transcripts in the Adult Female Mosquito *Anopheles Gambiae*' *The Journal of Experimental Biology* 208(Pt 20) 3971–86
- Bahia, Ana C et al 2014 'Exploring *Anopheles* Gut Bacteria for *Plasmodium* Blocking Activity' *Environmental Microbiology* 16(9) 2980–94
- Bhatt Samir et al 2013 'The Global Distribution and Burden of Dengue' *Nature* 496(7446) 504–7
- Brady Oliver J et al 2012 'Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence Based Consensus' *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(8)
- Buchon Nicolas Nichole A Broderick Mickael Poidevin Sylvain Pradervand and Bruno Lemaitre 2009 'Drosophila Intestinal Response to Bacterial Infection: Activation of Host Defense and Stem Cell Proliferation' *Cell Host and Microbe*
- CDC n d 'Epidemiology | Dengue | CDC'
- Christophides George K et al 2002 'Immunity Related Genes and Gene Families in *Anopheles Gambiae*' *Science (New York NY)* 298(5591) 159–65
- Cirimotich Chris M Yuemei Dong Lindsey S Garver Shuzhen Sim and George Dimopoulos 2010 'Mosquito Immune Defenses against *Plasmodium* Infection' *Developmental and Comparative Immunology*



- Coon Kerri L Kevin J Vogel Mark R Brown and Michael R Strand 2015 Mosquitoes Rely on Their Gut Microbiota for Development 23(11) 2727–39
- Desiely S Gusmão et al 2010 Culture Dependent and Culture Independent Characterization of Microorganisms Associated with *Aedes Aegypti* (Diptera Culicidae) (L ) and Dynamics of Bacterial Colonization in the Midgut *Acta Tropica* 115(3) 275–81
- Dick Olivia Brathwaite et al 2012 Review The History of Dengue Outbreaks in the Americas *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 87(4) 584–93
- Dimopoulos George 2003 Insect Immunity and Its Implication in Mosquito–malaria Interactions *Cellular Microbiology* 5(1) 3–14
- Dimopoulos George Douglas Seeley Anna Wolf and Fotis C Kafatos 1998 Malaria Infection of the Mosquito *Anopheles Gambiae* Activates Immune Responsive Genes during Critical Transition Stages of the Parasite Life Cycle *EMBO Journal*
- Dong Yuemei Fabio Manfredini and George Dimopoulos 2009a Implication of the Mosquito Midgut Microbiota in the Defense against Malaria Parasites *PLoS Pathogens* 5(5)
- Dong Yuemei Fabio Manfredini and George Dimopoulos 2009b Implication of the Mosquito Midgut Microbiota in the Defense against Malaria Parasites *PLoS Pathogens*
- Dorn Patricia L François C Noireau Elliot S Krafur Gregory C Lanzaro and Anthony J Cornel 2011 *Genetics of Major Insect Vectors*
- Douglas A E S Bouvaine and R R Russell 2011 How the Insect Immune System Interacts with an Obligate Symbiotic Bacterium *Proceedings Biological Sciences / The Royal Society*
- Engel Philipp and Nancy A Moran 2013 The Gut Microbiota of Insects Diversity in Structure and Function *FEMS Microbiology Reviews* 37(5) 699–735

- Frature Malou et al 2009 Two Mosquito LRR Proteins Function as Complement Control Factors in the TEP1 Mediated Killing of Plasmodium *Cell Host and Microbe* 5(3) 273–84
- Gupta, Lahita et al 2009 The STAT Pathway Mediates Late Phase Immunity against Plasmodium in the Mosquito *Anopheles Gambiae* *Cell Host and Microbe* 5(5) 498–507
- Hillyer Julian F Shelley L Schmidt and Bruce M Christensen 2003 Rapid Phagocytosis and Melanization of Bacteria and Plasmodium Sporozoites by Hemocytes of the Mosquito *Aedes Aegypti* *The Journal of Parasitology* 89(1) 62–69
- Hillyer Julian F 2010 Mosquito Immunity *Advances in Experimental Medicine and Biology*
- Hillyer Julian F Shelley L Schmidt and Bruce M Christensen 2004 The Antibacterial Innate Immune Response by the Mosquito *Aedes Aegypti* Is Mediated by Hemocytes and Independent of Gram Type and Pathogenicity *Microbes and Infection*
- Jansen Cassie C and Nigel W Beebe 2010 The Dengue Vector *Aedes Aegypti* What Comes next *Microbes and Infection*
- Jones Gerwyn M et al 2016 Digital PCR Dynamic Range Is Approaching that of Real Time Quantitative PCR *Biomolecular Detection and Quantification* 10 31–33
- Jupatanakul Natapong Shuzhen Sim and George Dimopoulos 2014 The Insect Microbiome Modulates Vector Competence for Arboviruses *Viruses* 6(11) 4294–4313
- Kato Nobutaka et al 2008 Evaluation of the Function of a Type I Peritrophic Matrix as a Physical Barrier for Midgut Epithelium Invasion by Mosquito Borne Pathogens in *Aedes Aegypti* *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 8(5) 701–12
- Kraemer Moritz U G et al 2015 The Global Distribution of the Arbovirus Vectors *Aedes Aegypti* and *Ae Albopictus* *eLife* 4(JUNE2015)

- Medzhitov R and Charles A Jr Janeway 1997 Innate Immunity Minireview the Virtues of a Nonclonal System of Recognition *Cell* 91 295–98
- Miller Matthew J and Jose R Loaiza 2015 Geographic Expansion of the Invasive Mosquito *Aedes Albopictus* across Panama—Implications for Control of Dengue and Chikungunya Viruses *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9(1) e0003383
- Minard Guillaume Patrick Mavingui and Claire Valiente Moro 2013 Diversity and Function of Bacterial Microbiota in the Mosquito Holobiont *Parasites & Vectors* 6(1) 146
- Moran Nancy A and Paul Baumann 2000 Bacterial Endosymbionts in Animals *Current Opinion in Microbiology* 3(3) 270–75
- Moreira Luciano A et al 2009 A Wolbachia Symbiont in *Aedes Aegypti* Limits Infection with Dengue Chikungunya and Plasmodium *Cell*
- Moreno Garcia Miguel Benito Recio Totoro Fabiola Claudio Piedras and Humberto Lanz Mendoza 2014 Injury and Immune Response Applying the Danger Theory to Mosquitoes *Frontiers in Plant Science* 5(September) 451
- Nelson Michael 1986 Michael Nelson 1986 pdf
- Organization World Health n d *Reported Cases of Dengue Fever in Th Americas by Country or Territory 2017*
- Ramirez Jose Luis et al 2012 Reciprocal Tripartite Interactions between the *Aedes Aegypti* Midgut Microbiota, Innate Immune System and Dengue Virus Influences Vector Competence *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(3) 1–11
- Ramirez Jose Luis et al 2014 *Chromobacterium Csp\_P* Reduces Malaria and Dengue Infection in Vector Mosquitoes and Has Entomopathogenic and In Vitro Anti Pathogen Activities *PLoS*



*Pathogens* 10(10)

- Ricci Irene Claudia Damiani et al 2012 Mosquito/microbiota Interactions From Complex Relationships to Biotechnological Perspectives *Current Opinion in Microbiology* 15(3) 278–84
- Ricci Irene Matteo Valzano et al 2012 Symbiotic Control of Mosquito Borne Disease *Pathogens and Global Health* 106(7) 380–85
- Rio R V M Youjia Hu and Serap Aksoy 2004 Strategies of the Home Team Symbioses Exploited for Vector Borne Disease Control *Trends in Microbiology* 12(7) 325–36
- Rossi Gustavo C and Walter R Almiron 2004 Clave Ilustrada Para La Identificacion de Larvas de Mosquitos de Interes Sanitario Encontradas En Criaderos Artificiales En La Argentina *Serie Enfermedades Transmisibles Monografia*(5) 54
- Sachs Sonia Ehrlich Jeffrey D Sachs D Ph and Lorenzo Savioli 2008 Control of Neglected Tropical Diseases 1018–27
- Shao Ming Wei et al 2015 Diversity Bacterial Symbionts and Antibacterial Potential of Gut Associated Fungi Isolated from the *Pantala Flavescens* Larvae in China *PLoS ONE* 10(7) 1–10
- Soper F L 1963 The Elimination of Urban Yellow Fever in the Americas through the Eradication of *Aedes Aegypti* *American Journal of Public Health* 53 7–16
- Souza Neto Jayme A Shuzhen Sim and George Dimopoulos 2009 An Evolutionary Conserved Function of the JAK STAT Pathway in Anti Dengue Defense *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(42) 17841–46
- Sutherst Robert W 2004 Global Change and Human Vulnerability to Vector Borne Diseases

- Global Change and Human Vulnerability to Vector Borne Diseases *Clinical Microbiology Reviews* 17(1) 136–73
- Szpilman David Joost Jim Bierens Anthony J Handley and James P Orlowski 2012 Review Article *The New England Journal of* 2102–10
- Tfelt Hansen Peer C and Peter J Koehler 2011 Current Concepts Dengue *The New England Journal of Medicine* 51(5) 752–78
- Tsakas S and Vj Marmaras 2010 Insect Immunity and Its Signalling An Overview *ISJ* 7 228–38
- Tzou Phoebe Jean Marc Reichhart and Bruno Lemaitre 2002 Constitutive Expression of a Single Antimicrobial Peptide Can Restore Wild Type Resistance to Infection in Immunodeficient *Drosophila* Mutants *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(4) 2152–57
- Valiente Moro Claire Florence Helene Tran Fara Nantenaina Raharimalala, Pierre Ravelonandro and Patrick Mavingui 2013 Diversity of Culturable Bacteria Including *Pantoea* in Wild Mosquito *Aedes Albopictus* *BMC Microbiology* 13(1) 70
- Watts Douglas M Donald S Burke Bruce A Harrison Richard E Whitmire and Ananda Nisalak 1987 Effect of Temperature on the Vector Efficiency of *Aedes Aegypti* for Dengue 2 Virus *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36(1) 143–52
- Whitehead S S J E Blaney A P Durbin and B R Murphy 2007 Prospects for a Dengue Virus Vaccine *Nat Rev Microbiol* 5(August 2007) 518–28
- World Health Organization 2009 Dengue Guidelines for Diagnosis Treatment Prevention and Control *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases* x 147

- Xi Zhiyong, Jose L. Ramirez, and George Dimopoulos. 2008. The *Aedes Aegypti* Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection. *PLoS Pathogens* 4(7).
- Yun Ji Hyun et al. 2014. Insect Gut Bacterial Diversity Determined by Environmental Habitat Diet, Developmental Stage, and Phylogeny of Host. *Applied and Environmental Microbiology* 80(17): 5254–64.